

**ANWENDBARKEIT ENZYMIMMUNOLOGISCHER
VERFAHREN ZUM NACHWEIS EINIGER MYKO-
TOXINE (AFLATOXIN B₁, AFLATOXIN M₁, OCHRA-
TOXIN A, ZEARALENON, T-2 TOXIN, DIACETOXY-
SCIRPENOL, RORIDIN A) IN LEBENSMITTELN
TIERISCHEN UND PFLANZLICHEN URSPRUNGS**

Richard Dietrich

Disbui. München

1989



Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl: Prof. Dr. Dr. h.c. G. Terplan)
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Anwendbarkeit enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis einiger
Mykotoxine (Aflatoxin B₁, Aflatoxin M₁, Ochratoxin A, Zearalenon,
T-2 Toxin, Diacetoxyscirpenol, Roridin A) in Lebensmitteln
tierischen und pflanzlichen Ursprungs

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Richard D i e t r i c h

aus

Hirschau

München 1989

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr.h.c. G. Terplan

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. R. Schulz

Tag der Promotion: 28. Juli 1989

Für Ute und Franziska



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis:

		Seite
1	Einleitung	1
2	Schrifttum	3
2.1	Allgemeines	3
2.1.1	Aflatoxin B ₁	3
2.1.2	Afatoxin M ₁	4
2.1.3	Ochratoxin A	5
2.1.4	Citrinin	6
2.1.5	Trichothecene (T-2 Toxin, Diacetoxyscirpenol, Roridin A)	7
2.1.6	Zearalenon	9
2.2	Mykotoxine in Lebensmitteln	11
2.2.1	Milch und Käse	11
2.2.1.1	Aflatoxin M ₁	11
2.2.1.1.1	Verhalten bei Erhitzungsverfahren	11
2.2.1.1.2	Verhalten bei Milchfraktionierung und Käseherstellung	14
2.2.1.1.3	Verhalten bei Käserreifung und -lagerung	16
2.2.1.1.4	Vorkommen in Käse	19
2.2.2	Fleisch	19
2.2.2.1	Ochratoxin A	21
2.2.2.1.1	Rückstandsbildung	21
2.2.2.1.2	Vorkommen in Schweinenieren	22
2.2.3	Getreide	22
2.2.3.1	Aflatoxin B ₁	22
2.2.3.2	Ochratoxin A	24
2.2.3.3	Citrinin	25
2.2.3.4	Trichothecene (T-2 Toxin, Diacetoxyscirpenol, Roridin A)	25
2.2.3.5	Zearalenon	25

2.3	Extraktions- und Nachweisverfahren	26
2.3.1	Aflatoxin B ₁	28
2.3.2	Afatoxin M ₁	29
2.3.3	Ochratoxin A	29
2.3.4	Citrinin	35
2.3.5	Gemeinsamer Nachweis von Citrinin und Ochratoxin A	37
2.3.6	Trichothecene (T-2 Toxin, Diacetoxyscirpenol, Roridin A)	37
2.3.7	Zearalenon	39
2.3.8	Multimykotoxin-Methoden	40
3	E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n	45
3.1	Materialien, Geräte und Methodik	45
3.1.1	Chemikalien und Biochemika	45
3.1.2	Puffer und Lösungen	45
3.1.3	Mykotoxine	45
3.1.4	Geräte	46
3.1.5	Immunoreagenzien	47
3.1.6	Durchführung der enzymimmunologischen Nachweisverfahren	50
3.2	Entwicklung von Extraktionsmethoden zum Nachweis von Mykotoxinen in Zerealien mittels ELISA	56
3.2.1	Vorversuche	56
3.2.1.1	Material und Methode	56
3.2.1.2	Ergebnisse	57
3.2.2	Nachweis von Aflatoxin B ₁ , Zearalenon, T-2 Toxin, Diacetoxyscirpenol und Roridin A in Zerealien mittels ELISA	58
3.2.2.1	Material und Methode	58
3.2.2.2	Ergebnisse	58
3.2.3	Nachweis von Ochratoxin A in Zerealien mittels ELISA	66
3.2.3.1	Material und Methode	66
3.2.3.2	Ergebnisse	67

3.3	Entwicklung einer Extraktionsmethode zum Nachweis von Ochratoxin A und Citrinin in Zerealien mittels HPLC	69
3.3.1	Nachweis in künstlich kontaminierten Zerealien	69
3.3.1.1	Material und Methode	69
3.3.1.2	Ergebnisse	71
3.3.2	Nachweis in natürlich kontaminierten Zerealien	76
3.3.2.1	Material und Methode	76
3.3.2.2	Ergebnisse	76
3.4	Vergleich zwischen ELISA und HPLC-Testsystemen zum Nachweis von Mykotoxinen in Zerealien	78
3.4.1	Zearalenon	78
3.4.1.1	Material und Methode	78
3.4.1.2	Ergebnisse	78
3.4.2	Ochratoxin A	80
3.4.2.1	Material und Methode	80
3.4.2.2	Ergebnisse	80
3.5	Nachweis von Mykotoxinen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs mittels ELISA	82
3.5.1	Nachweis von Ochratoxin A in Schweinenieren	82
3.5.1.1	Material und Methode	82
3.5.1.2	Ergebnisse	83
3.5.2	Nachweis von Aflatoxin M ₁ in natürlich kontaminierter Milch	84
3.5.2.1	Material und Methode	84
3.5.2.2	Ergebnisse	86
3.5.3	Nachweis von Aflatoxin M ₁ in verschiedenen Milchfraktionen	88
3.5.3.1	Material und Methode	88
3.5.3.2	Ergebnisse	88
3.5.4	Nachweis von Aflatoxin M ₁ in künstlich kontaminiertem Käse	93
3.5.4.1	Material und Methode	93
3.5.4.2	Ergebnisse	93

3.5.5	Nachweis von Aflatoxin M ₁ in natürlich kontaminiertem Käse	95
3.5.5.1	Herstellung eines natürlich mit Aflatoxin M ₁ kontaminierten Camembert	95
3.5.5.1.1	Material und Methode	95
3.5.5.1.2	Ergebnisse	96
3.5.5.2	Nachweis von Aflatoxin M ₁ während Reifung und Lagerung eines natürlich kontaminierten Camembert	98
3.5.5.2.1	Material und Methode	98
3.5.5.2.2	Ergebnisse	98
3.6	Anwendung der entwickelten Extraktionsmethoden	101
3.6.1	Nachweis von Mykotoxinen in Hafer und Winterweizen aus der besonderen Ernteerhebung der Jahre 1987 und 1988 mittels ELISA	101
3.6.1.1	Material und Methode	101
3.6.1.2	Ergebnisse	101
3.6.2	Nachweis von Mykotoxinen in Verdachtsproben der Ernte 1987 mittels ELISA	105
3.6.2.1	Material und Methode	105
3.6.2.2	Ergebnisse	105
3.6.3	Nachweis von Mykotoxinen in Lagerproben aus Problembetrieben mittels ELISA	108
3.6.3.1	Material und Methode	108
3.6.3.2	Ergebnisse	108
3.6.4	Nachweis von Mykotoxinen in Mehlproben	112
3.6.4.1	Material und Methode	112
3.6.4.2	Ergebnisse	112
3.6.5	Nachweis von Mykotoxinen in zerealienhaltigen Lebensmitteln	113
3.6.5.1	Material und Methode	113
3.6.5.2	Ergebnisse	113
4	D i s k u s s i o n	115
4.1	Entwicklung von Extraktions- und Aufbereitungsverfahren für den Nachweis von Mykotoxinen in Lebensmitteln mittels ELISA	115

4.1.1	Aflatoxin B ₁ , Zearalenon, T-2 Toxin, Diacetoxyscirpenol und Roridin A in Zerealien	118
4.1.2	Ochratoxin A in Zerealien und Schweinenieren	121
4.1.3	Aflatoxin M ₁ im Käse	123
4.2	Verifizierung der enzymimmunologisch gewonnenen Ergebnisse für Zearalenon und Ochratoxin A in Zerealien mittels HPLC	124
4.2.1	Nachweis von Ochratoxin A und Citrinin mittels HPLC	125
4.2.2	Vergleich zwischen HPLC- und ELISA-Testsystemen	126
4.3	Anwendbarkeit des ELISA zum Nachweis von nicht extrahierbarem Aflatoxin M ₁ in Milch und Käse	127
4.4	Vorkommen von Mykotoxinen in Zerealien und zerealienhaltigen Lebensmitteln	132
5	Z u s a m m e n f a s s u n g	135
6	L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s	141

1 Einleitung

Bisher sind mehr als 300 Mykotoxine, sekundäre Stoffwechselprodukte verschiedener Schimmelpilze, vor allem der Gattungen *Aspergillus*, *Fusarium* und *Penicillium*, beschrieben. Kontaminationen von Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs sind unter den klimatischen Bedingungen Mitteleuropas nach bisherigen Erkenntnissen, mit Ochratoxin A - einem Gift mit nephrotoxischen, immunsuppressiven, teratogenen und karzinogenen Eigenschaften -, mit dem östrogen wirksamen Zearalenon und den hochtoxischen Trichothecenen zu erwarten. Die hepatotoxischen, mutagen und kanzerogen wirksamen Aflatoxine werden dagegen hauptsächlich in Ländern mit höheren Temperaturen und Luftfeuchtigkeiten gebildet und mit den kontaminierten Lebens- und Futtermitteln importiert. Nach Aufnahme von kontaminierten Futtermitteln durch landwirtschaftliche Nutztiere kommt es durch "carry over" zu einer indirekten Kontamination von Lebensmitteln tierischen Ursprungs. Lebensmittelhygienisch beachtliche Probleme stellen hier zum einen Ochratoxin A Rückstände in Schweinefleisch und zum anderen die Aflatoxin M₁ Belastung der Milch dar.

Um die Gesundheitsgefährdung des Verbrauchers durch Mykotoxine möglichst gering zu halten, sind regelmäßige Untersuchungen besonders gefährdeter Lebensmittel notwendig. Für die Bewältigung großer Probenumfänge stellen enzymimmunologische Nachweisverfahren die Methode der Wahl dar. Solche Verfahren werden am Institut schon seit längerer Zeit entwickelt. Der schnelle und einfache Nachweis von Aflatoxin B₁ (BIERMANN und TERPLAN, 1980), Aflatoxin M₁ (MÄRTLBAUER und TERPLAN, 1985), Ochratoxin A (MÄRTLBAUER und TERPLAN, 1988), T-2 Toxin (ESGIN, 1987), Diacetoxyscirpenol (KLAFFER et al., 1987), Roridin A (MÄRTLBAUER et al., 1988) und Zearalenon (RENZ, 1989) wurde dadurch möglich.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Anwendbarkeit dieser enzymimmunologischen Verfahren zum Nachweis von Mykotoxinen in Lebensmitteln aufzuzeigen. Dies beinhaltete die Erarbeitung geeigneter Extraktions- und Aufbereitungsmethoden und die Bestätigung bzw. Ergänzung enzymimmunologisch gewonnener Ergebnisse mit



physikalisch-chemischen Methoden. Für die Prüfung der Praktikabilität der entwickelten Methoden beim routinemäßigen Einsatz bei der Untersuchung von Zerealien bot sich insbesondere das aus der Praxis in den Jahren 1987 und 1988 eingesandte Material an. Diese Erhebungen waren auch als Information wesentlich, inwieweit bei diätetischen Lebensmitteln mit Milch oder Milchinhaltsstoffen als Grundlage eine Mykotoxinbelastung seitens der Zerealienanteile zu erwarten ist. Desweiteren sollte am Beispiel des mit üblichen Methoden nicht nachweisbaren Aflatoxin-M₁-Anteils in der Milch eine weitere Anwendungsmöglichkeit der serologischen Verfahren aufgezeigt werden.

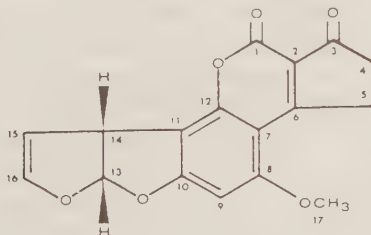
2 S c h r i f t t u m

Da die Fülle der vorliegenden Literatur über Aflatoxin B₁, Aflatoxin M₁, Ochratoxin A, Citrinin, T-2 Toxin, Diacetoxyscirpenol, Roridin A und Zearalenon den Rahmen dieser Arbeit bei weitem sprengen würde, soll im folgendem nur auf solche Teilaspekte näher eingegangen werden, die zum Verständnis der eigenen Untersuchungen wichtig erscheinen. Dies betrifft einige allgemeine Angaben, insbesondere aber Extraktionsmethoden, enzymimmunologische Nachweisverfahren und Besonderheiten bei den Lebensmitteln tierischen Ursprungs. Hinsichtlich weitergehender Informationen wird in den einzelnen Kapiteln jeweils auf Übersichtsartikel bzw. auf in den letzten Jahren an der Fakultät angefertigte Dissertationsarbeiten verwiesen.

2.1 Allgemeines

2.1.1 Aflatoxin B₁

Aflatoxin B₁ (AFB₁) (Abb. 1), ein Difuranocumarin, das von *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus* gebildet wird, ist seit seiner Entdeckung Anfang der sechziger Jahre Gegenstand zahlreicher Veröffentlichungen, da es neben einer ausgeprägten Toxizität (LD₅₀ bei oraler Applikation 0,3 bis 17,9 mg/kg Körpergewicht) auch stark mutagene und kanzerogene Wirkungen aufweist (RODRICKS et al., 1977). Über den Metabolismus wurde erst kürzlich in einer am Institut angefertigten Dissertationsarbeit ausführlich referiert (MÄRTLBAUER, 1988).



2.1.2 Aflatoxin M₁

Wird mit AFB₁ kontaminiertes Futter, vor allem Erdnußprodukte, Baumwollsaamen, Mais, handelsübliche Kraftfuttermittel, aber auch Maissilage, Sojaschrot und Getreide von Milchkühen aufgenommen, erreichen nach ENGEL und HAGEMEISTER (1978) nur 2 - 5% des Mykotoxins den Dünndarm, während die restlichen 95% und mehr in den Vormägen (in vitro bis 42%) abgebaut bzw. resorbiert werden. Der Abbau im Pansen wird allerdings von anderen Autoren bezweifelt (KIESSLING et al., 1984). In der Leber wird das aufgenommene AFB₁ von cytoplasmatischen und mikrosomalen Enzymen metabolisiert, u.a. zum blauviolett fluoreszierenden Aflatoxin M₁ (AFM₁) (Abb. 2). Nach POLAN et al. (1974) werden von dem aufgenommenen AFB₁ als AFM₁ 1,8% in der Milch, 5% im Faeces und 3,2% im Harn gefunden.

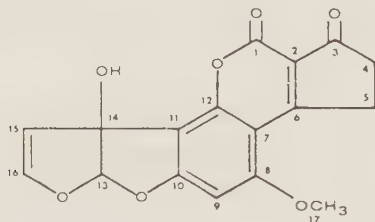


Abbildung 2: Strukturformel des Aflatoxin M₁

Seitdem die Karzinogenität des AFM₁ an Ratten (WOGAN und PAGLIA-LUNGA, 1974) und Regenbogenforellen (CANTON et al., 1975) nachgewiesen wurde, hat die Ausscheidung über die Milch als mögliche Gesundheitsgefährdung für den Menschen besonderes Interesse erweckt. Nach einer Literaturübersicht von SIEBER und BLANC (1978) ergibt sich folgendes Bild: bereits fünf Stunden nach der Aufnahme von AFB₁ kann AFM₁ in der Milch nachgewiesen werden. Die Ausscheidungsquote von AFM₁ in der Milch weist einen linearen Bezug zur täglichen Aufnahme von AFB₁ auf und liegt größtenteils unter 1,5%. Neuere Untersuchungen (MUNKSGAARD et al., 1987) sprechen hingegen von einem exponentiellen Bezug:

$$\text{ng AFM}_1 \text{ pro kg Milch} = 1,24 \times (\mu\text{g AFB}_1\text{-Aufnahme/Tag})^{0,834}$$

Über die biologischen Wirkungen des AFM₁ wurde erst kürzlich in einer am Institut erstellten Dissertationsarbeit referiert (HEUSEL, 1987). Im Vergleich zum AFB₁ weist AFM₁ eine etwa gleich hohe akute Toxizität auf, während die mutagene und die karzinogene Aktivität nur etwa 3% bzw. 2 - 10% der des AFB₁ betragen. Neben Lebertumoren ruft das AFM₁ aber auch intestinale Tumoren hervor (CULLEN et al., 1987).

Weitergehende Informationen können den folgenden Übersichtsarbeiten bzw. den dort zitierten Originalarbeiten entnommen werden: STOLOFF (1980), REISS (1981) und APPELBAUM et al. (1982).

2.1.3 Ochratoxin A

Ochratoxin A (Abb. 3), ein Sekundärmetabolit von verschiedenen *Aspergillus*- und *Penicillium*-Arten (KROGH, 1977a), besteht aus einem Isocoumarin-Anteil, der über eine α -Amidbindung an ein Molekül Phenylalanin gebunden ist. Seine physikalisch-chemischen Eigenschaften sind bei CHU (1974) zusammenfassend dargestellt.

Ochratoxin A bildende Pilze, wie *Aspergillus ochraceus* und *Penicillium viridicatum* treten ubiquitär auf; in kühleren Klimazonen sind aber vor allem die psychrotrophen Vertreter der Gattung *Penicillium*, insbesondere *P. viridicatum* Westling für die Ochratoxin A Bildung auf Zerealien von Bedeutung (KROGH, 1978).

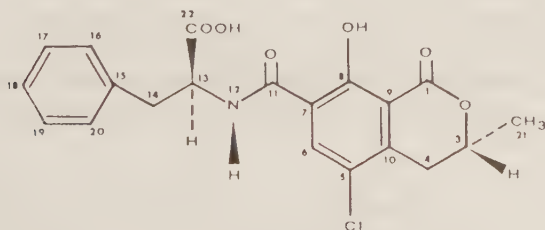


Abbildung 3: Strukturformel des Ochratoxin A

Ochratoxin A weist bei allen bisher untersuchten Tierarten - Schwein, Hund, Ratte, Maus, Meerschweinchen, Hamster, Huhn - neben einer Hepatotoxizität eine ausgeprägte Nephrotoxizität auf und gilt als Hauptursache der mykotoxischen Nephropathie des Schweines, die vor allem im skandinavischen Raum auftritt (KROGH, 1977a). Klinisch äußert sich diese Erkrankung in Wachstumsdepression, Polydipsie und Polyurie, pathologisch-anatomisch in vergrößerten Nieren mit graubrauner Verfärbung und fibrinösen Einlagerungen, histologisch in Degeneration der proximalen Nierentubuli, Atrophie der Glomeruli und interstitieller Fibrose (KROGH, 1974). Ein möglicher Zusammenhang zwischen einer Ochratoxin A Kontamination von Lebensmitteln und dem Auftreten der sogenannten "Endemic Balkan Nephropathy" des Menschen in Jugoslawien, Rumänien und Bulgarien wurde zuerst von KROGH et al. (1977) aufgezeigt und befindet sich immer noch in der Diskussion (HULT et al., 1982; PETKOVA-BOCHAROVA et al., 1988).

Neben der nephrotoxischen Wirkung weist Ochratoxin A noch immunsuppressive (HAUBECK et al., 1981), teratogene (MAYURA et al., 1982) und wahrscheinlich auch karzinogene (KANISAWA und SUZUKI, 1978) Eigenschaften auf.

2.1.4 Citrinin

Citrinin (Abb. 4) gehört wie Ochratoxin A zu den nephrotoxischen Mykotoxinen (MEHDI et al., 1981; HANIKA et al., 1984) und wird wie dieses von verschiedenen, weit verbreiteten Aspergillus- und Penicillium-Stämmen gebildet. Von *P. viridicatum* Westling ist bekannt, daß es beide Mykotoxine gleichzeitig bilden kann (SCOTT et al., 1970; KROGH, 1978). Citrinin weist daneben bei der Ratte fetotoxische und vermutlich auch teratogene Eigenschaften auf (REDDY et al., 1982a).

Während die akute Toxizität von Citrinin relativ gering ist (LD_{50} bei Maus i.p. 89 mg/kg; SANSING et al., 1976), sind von verschiedenen Autoren synergistische Effekte dieses Toxins mit anderen nephrotoxischen Chemikalien beschrieben worden. So führte

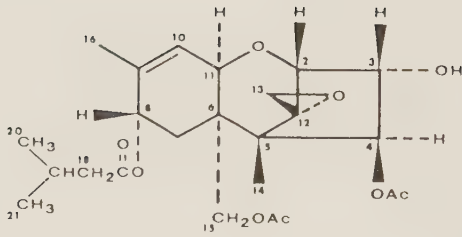


Abbildung 5: Strukturformel von T-2 Toxin

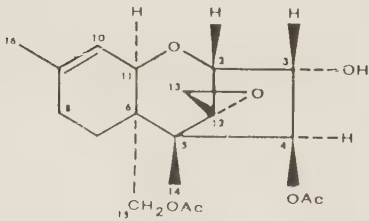


Abbildung 6: Strukturformel von Diacetoxyscirpenol

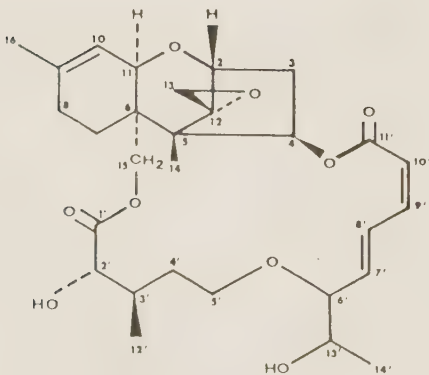


Abbildung 7: Strukturformel von Roridin A

zyklischen Trichothecene wie Roridin A (Abb. 7) besitzen zwischen C₄ und C₁₅ ein zusätzliches Ringsystem. Eine ausführliche Zusammenfassung über diese Mykotoxingruppe gibt UENO (1983).

12,13-Epoxytrichothecene weisen eine hohe akute Toxizität auf. Die LD₅₀-Werte für Mäuse nach intraperitonealer Applikation liegen für T-2 Toxin (Abb. 5) bei 5,2, für Diacetoxyscirpenol (DAS) bei 23,0 und für die makrozyklischen Trichothecene bei 0,5 mg/kg (SNYDER, 1986). Neben der akuten Toxizität besitzen Trichothecene - aufgrund einer Hemmung der Protein- und DNA-Synthese - noch eine ausgeprägte Hauttoxizität und eine Cytotoxizität in eukaryontischen Zellen (UENO und ISHII, 1985). Zumindest für T-2 Toxin wird auch eine kanzerogene oder cokanzerogene Wirkung diskutiert. Bei chronischer Verabreichung an Mäusen traten nämlich Leber- und Lungenadenome auf (SCHIEFER et al., 1987).

Der Metabolismus von T-2 Toxin und DAS wurde erst kürzlich in am Institut angefertigten Dissertationsarbeiten ausführlich besprochen (HACK, 1988; KLAFFER, 1988). Neben Acetylierung, Deacetylierung und Hydroxylierung bei T-2 Toxin (KOBAYASHI et al., 1987) und DAS ist nach neueren Untersuchungen auch die Deepoxydierung durch die Gastrointestinalflora bei Ratten, Wiederkäuern und Schweinen als Abbauweg von Bedeutung (SWANSON et al.; 1988). So weist Deepoxy-T-2 Toxin eine 400fach geringere Hauttoxizität auf als T-2 Toxin. Über den Metabolismus von Roridin A liegen in der zugänglichen Literatur keine Angaben vor. Verrucarin A, ein anderes makrozyklisches Trichothecen, scheint zumindest in der Haut metabolisiert zu werden (KEMPPAINEN et al.; 1987).

2.1.6 Zearalenon

Zearalenon (Abb. 8), ein Sekundärmetabolit verschiedener Fusarienarten, ist durch seine östrogene Wirkung charakterisiert. Zu den empfindlichsten Tieren gehört das weibliche Schwein. Nach BAUER et al. (1987) treten bereits bei einem Zearalenongehalt von 250 µg/kg Futter nach 5 bis 7 Tagen bei präpubertären weiblichen Läuferschweinen Symptome eines Hyperöstrogenismus auf. Bei einem

Zearalenongehalt von 50 µg/kg Futter wurde noch eine vermehrte Bildung von Tertiärfollikeln beobachtet.

MARASAS et al. (1979) zeigten eine Korrelation zwischen dem Vorkommen von *Fusarium moniliforme*, ein Zearalenon- und Deoxynivalenolbildner, und dem endemischen Auftreten von Ösophaguskrebs auf. Nach Angaben der International Agency for Research on Cancer (IARC) (1983) ist jedoch zur Zeit aufgrund fehlender weiterer epidemiologischer Daten eine Aussage über eine eventuelle karzinogene Wirkung des Zearalenons nicht möglich.

Weitergehende Informationen können den folgenden Übersichtsarbeiten der letzten Jahre entnommen werden: IARC (1983), KUIPER-GOODMAN et al. (1987), RENZ (1989).

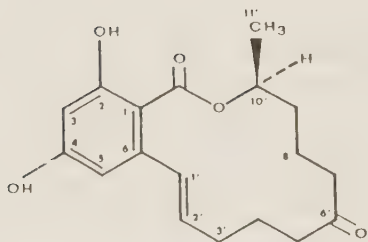


Abbildung 8: Strukturformel von Zearalenon

2.2 Mykotoxine in Lebensmitteln

2.2.1 Milch und Käse

Während Ochratoxin A im Pansen zum ungiftigen α -Ochratoxin abgebaut wird (KIESSLING et al., 1984) und über Citrinin keine Erkenntnisse hinsichtlich der Ausscheidung in die Milch vorliegen, wird nach Untersuchungen von YOSHIZAWA et al. (1981) mit radioaktiv markiertem T-2 Toxin nur 0,2% der Dosis größtenteils in Form von Metaboliten in die Milch ausgeschieden; für Zearalenon liegt die Ausscheidungsquote bei 0,7% (MIROCHA et al., 1981). In am Institut durchgeführten Untersuchungen lagen die mittels ELISA erfaßbaren Ausscheidungsraten in die Milch bei 0,05% für T-2 Toxin (ESGIN, 1987) bzw. bei 0,1% für Zearalenon (RENN, 1989).

2.2.1.1 Aflatoxin M₁

AFM₁ stellt nach bisherigen Erkenntnissen aufgrund seiner kanzerogenen Wirkung das einzige Mykotoxin dar, das in diesem Lebensmittelbereich durch indirekte Kontamination (carry over) eine Rolle spielt. Über das Vorkommen dieses Toxins in der Milch wird in einer anderen Dissertationsarbeit referiert (BACHNER, 1989), so daß sich die folgende Literaturübersicht auf die für die eigenen Untersuchungen relevanten Aspekte beschränken kann.

2.2.1.1.1 Verhalten bei Erhitzungsverfahren

Unterschiedliche Lagertemperaturen und Lagerzeiten wirken sich nach folgenden Autoren auf den AFM₁-Gehalt der Milch so aus: bei STOLOFF et al. (1975) hatte die Lagerung bei 4 °C für 17 Tage einer künstlich kontaminierten, pasteurisierten Milch keinen Einfluß auf den AFM₁-Gehalt der Milch (Ausgangskonzentration 1,7 µg/kg). Nach KIERMEIER und MASHALEY (1977) hingegen bedingt die Lagerung bei 5 °C für 1 - 3 Tage einen AFM₁-Verlust von 11 - 25% sowohl bei natürlich als auch bei künstlich kontaminierten Proben. Es wurden Rohmilch, pasteurisierte und ultrahocherhitzte Milch untersucht (Ausgangskonzentration 1,7 µg/kg). Bei Untersuchungen über die Auswirkung einer Lagerung bei -18 °C

ergab sich folgendes Bild: STOLOFF et al. (1975) berichteten, daß bei einer natürlich kontaminierten Milch nach einer Lagerdauer von 53 Tagen eine Zunahme von etwa 30%, nach 68 Tagen nur geringfügige (etwa 10%), nach 120 Tagen starke Verluste (37 - 50%) auftraten (Ausgangskonzentration 5,4 - 6,0 µg/kg). In den Untersuchungen von KIERMEIER und MASHALEY (1977) bedingte eine Lagerdauer von sechs Tagen bei -18 °C bei einer natürlich kontaminierten Probe eine Abnahme des AFM₁-Gehaltes von 1,8 - 7,8%, bei einer künstlich kontaminierten Probe dagegen eine Abnahme von 31,6% (Ausgangskonzentration 1,4 - 4,2 µg/kg). WISEMAN und MARTH (1983a) berichten, daß AFM₁ in Eiscreme und Sorbet (hergestellt unter Verwendung einer natürlich kontaminierten Milch) während einer achtmonatigen Gefrierperiode nicht abgebaut wurde.

Die z.T. widersprüchlichen Ergebnisse wurden von APPLEBAUM et al. (1982) auf die unterschiedliche Kontamination, Extraktion und Nachweismethodik zurückgeführt.

Da die Milch üblicherweise bei der Herstellung der meisten Käsearten und bevor sie in den Handel gebracht wird, einem Pasteurierungs- bzw. Thermisierungsverfahren unterworfen wird, war der Einfluß dieser Verfahren auf den AFM₁-Gehalt der Milch auch Gegenstand einiger Untersuchungen, die in Tab. 1 wiedergegeben sind. POLZHOFFER (1977b) setzte einem Emmentaler, der anschließend zu Schmelzkäse verarbeitet wurde, AFM₁ zu. Selbst Schmelzzeiten von 30 min bei 90 °C hatten keinen wesentlichen Einfluß (Ausgangskonzentration 10 µg/kg).

APPLEBAUM et al. (1982) schließen aus der vorhandenen Literatur auf eine allenfalls geringe Bedeutung der Pasteurisierung und anderer thermischer Behandlungsverfahren hinsichtlich einer Inaktivierung des AFM₁.

Tabelle 1: Einfluß verschiedener Erhitzungsverfahren auf den AFM₁-Gehalt der Milch

Erhitzung	Kontaminations- art	Ausgangskon- zentration (in µg/l)	Abnahme des AFM ₁ - Gehaltes (in %)	Referenz
62 °C, 30 min	natürlich	385	32,5	PURCHASE et al. (1972)
62 °C, 30 min	künstlich	1,4-4,2	35,2	KIERMEIER und MASHALEY (1977)
63 °C, 30 min	künstlich	1,8-2,0	0	STOLOFF et al. (1975)
64 °C, 30 min	natürlich	1,7-3,1	stabil	WISEMAN und MARTH
	künstlich	3,4-4,1	stabil	(1983b)
71 °C, 40 sec	natürlich	1,4-4,2	9,9	KIERMEIER und MASHALEY (1977)
	künstlich	1,4-4,2	28,9	PURCHASE et al.
72 °C, 45 sec	natürlich	385	45,5	(1972)
80 °C, 45 sec	natürlich	385	63,7	WISEMAN und MARTH (1983b)
84 °C, 120 min	natürlich	2,2-5,4	stabil	
	künstlich	2,1-3,6	stabil	
100 °C, 120 min	natürlich	2,0	stabil	
120 °C, 15 min	natürlich	1,4-4,2	24,3	KIERMEIER und MASHALEY (1977)
	künstlich	1,4-4,2	24,5	

2.2.1.1.2 Verhalten bei Milchfraktionierung und Käseherstellung

Nach oraler Verabreichung von radioaktiv markiertem AFB_1 an Ziegen konnte die Verteilung der Radioaktivität in der Milch bestimmt werden. Während davon nach GOTO und HSIEH (1985) über 80% dichlormethanollöslich sind, geben HELFERICH et al. (1986) Werte von etwa 50% an.

Bei der Entfettung der Milch verbleiben nach BLANC et al. (1983) 96,7% des AFM_1 in der Magermilch, nach KIERMEIER und MASHALEY (1977) nur 84,7%, und nach GRANT und CARLSON (1971) gar nur 75%.

Schon ALLCROFT und CARNAGHAN (1962) beschrieben eine Affinität des AFM_1 zum Casein, da bei der Fällung der Proteinfraction mit Trichloressigsäure nur mehr die Proteinfraction eine toxische Wirkung im Entenkükentest aufwies. Diese Anreicherung des AFM_1 im relativ kleinen Gewichtsanteil des Caseins bzw. bei der Käseherstellung im Bruch wurde inzwischen von vielen Autoren bestätigt. Nur PURCHASE et al. (1972) berichten, daß nach der Herstellung von Hüttenkäse mit natürlich kontaminierter Milch AFM_1 nur in der Sauermolke nachweisbar war. Ansonsten wurde von allen Autoren, die sich mit dieser Problematik beschäftigten, eine Anreicherung des AFM_1 im Bruch beobachtet. Eine Übersicht hierzu gibt Tab. 3. Über die in der Literatur vorhandenen Angaben über die prozentuale Verteilung des AFM_1 auf Molke und Bruch gibt Tab. 2 Auskunft.

KIERMEIER und BUCHNER (1977a) untersuchten den Einfluß verschiedener Bruchbereitungen auf den AFM_1 -Verteilungsquotienten Molke zu Bruch:

- steigende Labmengen und damit kürzere Dicklegungszeiten bei gleicher Temperatur haben keinen Einfluß
- steigende Einlabungstemperaturen bei konstanter Labmenge bedingen eine Abnahme des prozentualen Toxinanteils im Bruch
- Waschen des Käsebruches - üblich bei einigen Hart- und Schnittkäsen sowie bei Hüttenkäse - , d.h. Zugabe von heißem Wasser erniedrigt bei steigender Waschwassermenge die AFM_1 -Konzentra-

Tabelle 2: Prozentuale Verteilung des AFM₁ in Bruch und Molke während der Käseherstellung
(in Anlehnung an BLANC et al., 1983)

Kontamina- tionsart	Labfällung % im Bruch	% in der Molke	Säurefällung % im Sauer- bruch	% in Sauer- molke	Referenz
künstlich	44-56 ²⁾	44-50 ²⁾	50	40 ¹⁾	GRANT und CARLSON (1971) STUBBLEFIELD und SHANNON (1974)
künstlich			30-55 ²⁾	47-74 ²⁾	
natürlich	80 ³⁾	20 ³⁾			MC KINNEY et al. (1973) KIERMEIER und BUCHNER (1977a)
natürlich	51,5 ⁴⁾	42,2	54,2 ⁶⁾	42,7	
	58,4 ⁵⁾	40,5			
künstlich	50,7	44,4	54,2 ⁷⁾	42,7 ⁷⁾	BLANC et al. (1983)
künstlich	49,3	48,6	41,9	51,2	

- 1) 10% im Waschwasser
2) abhängig vom hergestelltem Käse
3) Gesamtwiederverfindung nur 53%
7) keine signifikanten Unterschiede zwischen Fällung durch organische Säuren und Säuerungskulturen
- 4) bei Herstellung von Tilsiter
5) bei Herstellung von Camembert
6) bei Herstellung von Frischkäse

- tion des Bruches; diese Reduktion wirkt sich jedoch bei den in der Praxis üblichen Waschwassermengen nicht aus
- Bruchherstellung durch Säuerung hat keinen Einfluß auf die AFM₁-Verteilung zwischen Molke und Bruch.

Die aufgrund des Verhaltens bei der Käseherstellung (Labgerinnung, Trennung von Bruch und Molke) vermutete Bindung des AFM₁ an Casein wurde durch Untersuchungen von BRACKETT und MARTH (1982c) erhärtet. Simuliertes Milchultrafiltrat, das künstlich mit AFM₁ kontaminiert worden war, wurde gegen simuliertes Milchultrafiltrat, das Caseinmicellen enthielt, dialysiert. Nach 24 h enthielt die Caseinmicellensuspension 2,5 - 2,9mal soviel AFM₁ wie das künstlich kontaminierte Ultrafiltrat. Desweiteren untersuchten diese Autoren eine natürlich kontaminierte Milch vor und nach einer Proteasebehandlung. Nach dem Eiweißabbau konnten sie bis zu 38,5% mehr AFM₁ nachweisen; allerdings blieb unklar, ob dies auf eine Freisetzung des Toxins aus seiner Bindung zum Casein oder nur auf eine effizientere Extraktion zurückzuführen war.

Weitere Hinweise darauf, daß es in einer natürlich kontaminierten Milch einen mit üblichen Methoden nicht extrahierbaren AFM₁-Anteil gibt, stammen von APPLEBAUM und MARTH (1982). Die Bruchgewinnung durch Säuerung, d.h. Ausfall des Caseins am isoelektrischen Punkt durch organische Säuren oder Säuerung durch Kulturen, ergab bei einem Hüttenkäse-Herstellungsversuch aus natürlich kontaminierter Milch in der Bilanz Wiederfindungsraten von über 150% gegenüber der Ausgangsmilch.

KIERMEIER und BUCHNER (1977b) berichten, daß AFM₁ auch eine Affinität zu den Molkenproteinen aufweist.

2.2.1.1.3 Verhalten bei der Käsereifung und -lagerung

Während bei Verwendung von künstlich kontaminierter Milch die AFM₁-Gehalte im daraus hergestellten Käse im Laufe der Reifung sich nicht verändern oder sogar stetig abnehmen (FREMY et al., 1979) wird bei Käsen, die mit natürlich kontaminierter Milch

Tabelle 3: Veränderung des Aflatoxin M₁-Gehaltes während Herstellung, Reifung und Lagerung von Käse aus natürlich kontaminierter Milch

Käseart	Anreicher- ungsfaktor ¹⁾	% Anstieg des AFM ₁ während Reifung	Zeitpunkt des An- stieges (in Wochen)	Referenz
Rahmfrischkäse	3,2	28,2 ²⁾	1-2	KIERMEIER und
Camembert	3,3	54,2 ²⁾	1-2	BUCHNER (1977a)
Tilsiter	3,7	22,6 ²⁾	1-2	
Cheddar	4,3	k.A. ³⁾	18-24	BRACKETT und
Parmesan	5,8	4)	-	MARTH (1982a)
Mozzarella	8,1	5)	-	BRACKETT und
Limburger	1,7	k.A.	8-16	MARTH (1982b)
				BRACKETT et al. (1982)

ng/kg AFM₁ im Käse

1) =

ng/kg AFM₁ in der Milch

- 2) bezogen auf die Trockenmasse 3) = keine Angaben
 4) höchste AFM₁-Konzentration direkt nach Herstellung
 5) gleichbleibende Werte bei Lagerung von 18 Wochen

hergestellt wurden, zu einem gewissen Zeitpunkt der Reifung eine AFM_1 -Zunahme beobachtet (Tab. 3). KIERMEIER und BUCHNER (1977b) untersuchten als erste diesen Problemkomplex und kamen zu folgenden Ergebnissen:

- auf die Trockenmasse bezogen ist die AFM_1 -Verteilung im Käse homogen
- während der ersten zwei Wochen der Reifung bzw. Lagerung nimmt der auf die Trockenmasse bezogene AFM_1 -Gehalt im Käse zu
- danach kommt es zu einer AFM_1 -Abnahme, die bis zu 25% im Vergleich zum Höchstwert betragen kann

Ähnliche Beobachtungen machten BRACKETT und MARTH (1982a) bei Herstellung, Reifung und Lagerung eines Cheddar-Käses und interpretierten diese überraschenden Befunde dahingehend, daß durch proteolytische und lipolytische Vorgänge während der Käsereifung die Bindung des AFM_1 an Casein gespalten wird und dadurch der gebundene Toxinanteil wieder nachweisbar wird. Bei Herstellung eines Schmelzkäses aus diesem Cheddar kam es ebenfalls zu einem Anstieg des nachweisbaren AFM_1 . Obwohl keine gesicherten Erkenntnisse über die Art der AFM_1 -Bindung an das Casein vorliegen, vermuten dieselben Autoren eine hydrophobe Wechselwirkung zwischen AFM_1 und Caseinanteilen und halten eine kovalente Bindung für unwahrscheinlich.

BRACKETT et al. (1982) beobachteten bei der Herstellung, Reifung und Lagerung von Limburger Käse, daß der Anstieg des AFM_1 abhängig vom Reifungszustand ist, d.h. in den Randschichten des Käses konnte früher als im Zentrum dieses Phänomen beobachtet werden. In den Randschichten trat dann auch zu einem früheren Zeitpunkt und in einem stärkeren Umfang zwar eine AFM_1 -Abnahme auf, die AFM_1 -Gehalte des Käses lagen jedoch wie bei KIERMEIER und BUCHNER (1977b) am Versuchsende noch über den Ausgangswerten. BRACKETT et al. (1982) führten diese Abnahme auf eine Reaktion des AFM_1 mit dem bei der Käsereifung entstehenden Ammoniak zurück. Bei Untersuchungen von WISEMAN und MARTH (1983b) hatte jedoch die Zugabe von NH_4OH keine Inaktivierung des AFM_1 in einer Pufferlösung zur Folge; die Autoren weisen allerdings darauf hin, daß bei der Reifung von Camembert und Limburger Ammoniakkonzentrationen entste-

hen, die die von ihnen getesteten Mengen um das Dreifache übersteigen. FREMY et al. (1979) berichten, daß bei der Herstellung von Camembert aus künstlich kontaminierter Milch AFM_1 schnell abgebaut wird. Bei Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Toxin verhielt sich das Abbauprodukt bei Extraktion und Aufreinigung an einer Kieselgelsäule wie AFM_1 .

Hinweise auf eine mögliche Inaktivierung des AFM_1 während der Käsereifung bzw. Lagerung geben auch KIERMEIER et al. (1978). Bei der Untersuchung eines drei Jahre alten, bei $-18^{\circ}C$ gelagerten Tilsiters mittels Massenspektrometrie fanden sie neben AFM_1 eine unbekannte Substanz, die charakteristische Peaks bei den Massenzahlen 211, 239, 368 und 384 aufwies.

2.2.1.1.4 Vorkommen in Käse

Infolge der beschriebenen Anreicherung des AFM_1 im Käse ist die hohe Anzahl positiver Proben in bisherigen Untersuchungen nicht verwunderlich. POLZHOFFER (1977a) untersuchte in den Jahren 1972 bis 1974 Handelskäse (Tab. 4). Die nachgewiesene durchschnittliche Kontamination der verschiedenen Käsesorten stand in Relation zum mittleren wahrscheinlichen Trockenmassegehalt. Nach HEESCHEN et al. (1986) nahmen in den Jahren 1981 bis 1985 die AFM_1 -Gehalte in der Milch stetig ab, weshalb in Untersuchungen der letzten Jahre auch im Käse deutlich geringere Maximalwerte gefunden wurden als von POLZHOFFER (1977a) beschrieben. Einen Überblick gibt Tab. 5.

2.2.2 Fleisch

Nach bisherigen Erkenntnissen spielen Rückstände der in dieser Literaturübersicht besprochenen Mykotoxine im Fleisch aufgrund der schnellen Metabolisierung keine Rolle mit Ausnahme des Ochratoxin A.

Tabelle 4: AFM₁-Gehalte (in ng/kg) verschiedener Käsesorten nach POLZHOFER (1977a)

	n	pos. ¹⁾ (%)	x _{max.} (ng/kg)	x
Friskkäse	80	42,5	510	230
Camembert	65	78,5	730	310
Hartkäse	77	97,4	1300	430
Schmelzkäse	134	29,9	550	260

n = Probenanzahl

x_{max.} = Maximalwert

pos. (%) = % positiver Proben x = arithmetisches Mittel

1) Nachweisgrenze 100 ng/kg

Tabelle 5: Vorkommen von Aflatoxin M₁ im Käse (in ng/kg)

Herkunfts- land	n	x _{min.} (ng/kg)	pos. (%)	% >250 ng/kg ¹⁾	Referenz
BRD	136	k.A.	69	-	KIERMEIER et al. (1977)
BRD	558	k.A.	42,1	16,5	KIERMEIER (1985)
Europa	118	50	6,8	3,4	TRUCKSESS und PAGE (1986)
BRD	34	5	26,5	-	PIVA et al. (1987)
Frankreich	82	5	19,5	2,4	
Niederlande	43	5	53,5	-	
Italien	416	5	31,3	2,2	
Belgien	19	10	78,9	-	BIJL et al. (1987)

1) derzeit gültiger Grenzwert in der Schweiz

x_{min.} = Nachweisgrenze

sonstige Abkürzungen siehe Tab. 4

2.2.2.1 Ochratoxin A

2.2.2.1.1 Rückstandsbildung

Bei Verfütterung von mit Ochratoxin A kontaminierten Futtermitteln an Wiederkäuer kommt es im Pansen zu einer Spaltung in das biologisch inaktive α -Ochratoxin und in Phenylalanin, so daß Rückstände in Milch und Fleisch bei diesen Tierarten nicht zu erwarten sind (HULT et al., 1976; KIESSLING et al., 1984). Bei Schweinen hingegen bindet sich das Toxin an verschiedene Plasmabestandteile. Neben einer Affinität zum Serumalbumin - die auch bei anderen Tierarten zu beobachten ist (CHU, 1973; GALTIER et al., 1981) - scheint es bei Mensch und Schwein noch eine weit höhere Affinität zu einem oder mehreren anderen Plasmabestandteilen mit einem Molekulargewicht von etwa 20000 zu geben (STOJKOVIC et al., 1984). Die aus diesen Affinitäten resultierende hohe Halbwertszeit für Ochratoxin A, die im Schweineplasma 88,8 h beträgt (GALTIER et al., 1981), führt dazu, daß es bei kontinuierlicher Aufnahme zu einer Anreicherung des Toxins im Schweineplasma kommt. Die höchsten Ochratoxin A Konzentrationen im Schlachtkörper von Schweinen konnten in der Niere gefunden werden, gefolgt von Leber, Muskel und Fett (KROGH, 1974; MADSEN et al., 1982). Nach einer vierwöchigen Ochratoxin A freien Fütterung waren keine Rückstände mehr feststellbar (KROGH et al., 1976). Aufgrund dieser Rückstände in Schlachtkörpern gilt in Dänemark folgende gesetzliche Regelung: der gesamte Schlachtkörper wird verworfen, wenn der Ochratoxin A Gehalt der Nieren 25 $\mu\text{g/kg}$ übersteigt; liegt der Toxingehalt über 10 $\mu\text{g/kg}$ werden dagegen nur die Niere und die Leber verworfen (BÜCHMANN und HALD, 1985). Rückstände von Ochratoxin A in Lebensmitteln tierischer Herkunft, die neben den Zerealien eine mögliche Kontaminationsquelle für den Menschen darstellen (BAUER und GAREIS, 1987), wurden auch in Broilern und Legehühnern nachgewiesen, wobei die höchsten Konzentrationen bei diesen Tieren allerdings in der Leber zu finden waren (MICCO et al., 1987; GOLINSKI et al., 1983).

2.2.2.1.2 Vorkommen in Schweinenieren

Über das Vorkommen von Ochratoxin A in Nieren von Schlachtschweinen im europäischen Raum gibt Tab. 6 Auskunft. Im Vergleich dazu ergaben Untersuchungen von Schweineseren in der BRD eine wesentlich höhere Belastungshäufigkeit (BAUER et al., 1984). Dies kann nach RUTQVIST et al. (1978) dadurch erklärt werden, daß nach Aufnahme von Ochratoxin A in der Niere nur 7 - 20% der in den Seren nachweisbaren Toxinmenge zu finden ist. SCHEUER und LEISTNER (1985) konnten Ochratoxin A auch in Brühwürsten in Konzentrationen bis zu 3,4 µg/kg nachweisen. Desweiteren konnte dieses Toxin, wie aufgrund der Nahrungskette zu erwarten war, auch in menschlichen Blutseren (BAUER und GAREIS 1987) und in Muttermilchproben (GAREIS et al., 1988) detektiert werden.

2.2.3 Getreide

Zerealien sind naturgemäß stets mit einer mehr oder weniger umfangreichen Mikroflora besiedelt. Bei der Schimmelpilzflora unterscheidet man zwischen Feld- und Lagerpilzen. Erstere haben bereits zum Zeitpunkt der Ernte das Getreidekorn besiedelt und bestehen im wesentlichen aus Vertretern der Gattungen *Alternaria*, *Cladosporium* und *Fusarium*. Umfang und Art der Kontamination ist vor allem von den Witterungsbedingungen während des Reifens abhängig. Die Lagerflora hingegen besteht im wesentlichen aus den Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium*, wobei deren Entwicklung im wesentlichen vom Wassergehalt des Substrates abhängig ist (SPICHER, 1981).

2.2.3.1 Aflatoxin B₁

Toxinbildende Stämme der Gattung *Aspergillus* treten bedingt durch deren Ansprüche an Temperatur und Feuchtigkeit vor allem in tropischen und subtropischen Gebieten auf; daher wird AFB₁ gemeinhin als "importiertes" Mykotoxin betrachtet.

Tabelle 6: Ochratoxin A Gehalte (in ng/g) von Schweinenieren

Herkunfts- land	n	pos. (%)	x _{min.} (ng/g)	x _{max.}	Nachweis- methode	Referenz
Dänemark ¹⁾	60	35	2,0	68	DC	KROGH (1977b)
Schweden ¹⁾	129	25	2,0	104,0	F	RUTQVIST et al. (1977)
BRD	54	11	0,2	0,75	DC	HOFMANN (1983)
Polen ¹⁾	113	24	k.A.	23	DC	GOLINSKI et al. (1984)
BRD	300	14	0,2	10,2	DC	SCHEUER et al. (1984)
Dänemark ¹⁾	25686	20	252)	450	DC	BÜCHMANN und HALD (1985)
England ¹⁾	303	37	0,5	12,4	ELISA	MORGAN et al. (1986)
BRD ¹⁾	104	21	0,1	1,8	HPLC	BAUER und GAREIS (1987)
Belgien ¹⁾	385	18	0,2	12,1	RIA	ROUSSEAU und VAN PETEGHEM (1989)

1) = Untersuchung von pathologisch-anatomisch veränderten Nieren

2) = in Dänemark gültiger Grenzwert, ab dem der gesamte Schlachtkörper verworfen wird

Abkürzungen:

n = Probenanzahl

pos. (%) = Prozentsatz positiver Proben

x_{min.} = Nachweisgrenze der verwendeten Methode

x_{max.} = Maximalwert

DC = Dünnschichtchromatographie

HPLC = Hochdruckflüssigkeitschromatographie

ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay

RIA = Radio-Immuno-Assay

F = Fluorimeter

Aufgrund der stark kanzerogenen Wirkung und der daraus resultierenden Gefährdung der menschlichen Gesundheit wurden gesetzliche Höchstmengenregelungen in vielen Ländern getroffen (STOLOFF, 1977), was auch die Vielzahl von Berichten über das Vorkommen von Aflatoxinen bedingt. Stellvertretend seien hier nur die Ergebnisse der Lebensmittelüberwachung in der BRD der Jahre 1980 - 1983 erwähnt, die von KIERMEIER (1985) veröffentlicht wurden. Neben Nüssen aller Art sind vor allem Mais und daraus hergestellte Produkte mit AFB₁ kontaminiert, während auf sonstigem Getreide dieses Toxin nicht nachweisbar war.

2.2.3.2 Ochratoxin A

Ochratoxin A wurde weltweit in Mais, Gerste, Weizen, Hafer, Roggen, Kaffeebohnen, Erdnüssen und auch im Heu nachgewiesen (KROGH, 1977a). Umfassende Untersuchungen über das Vorkommen dieses Toxins in Zerealien und Futtermitteln der Jahre 1982 - 1987 in der BRD wurden von BAUER und GAREIS (1987) vorgenommen. Ochratoxin A Gehalte bis zu 206 µg/kg (Wiederfindungsraten der angewandten Methode 20%, Nachweisgrenze 0,1 µg/kg) wurden nachgewiesen. Insgesamt waren von 984 Proben 12,9% mit Ochratoxin A kontaminiert. Weltweit wurden Vorkommenshäufigkeiten in bis zu 20% des Probenmaterials festgestellt (KROGH, 1977a). Bei der Untersuchung von Lebens- und Futtermitteln in Gebieten, in denen die mykotische Nephropathie des Schweines, beziehungsweise die "Endemic Balkan Nephropathy" des Menschen endemisch sind, konnten sogar Vorkommenshäufigkeiten von 58%, beziehungsweise bis zu 27,3% beobachtet werden (KROGH et al., 1973; PETKOVA-BOCHAROVA und CASTEGNARO, 1985).

Ochratoxin A konnte desweiteren auch in verschimmeltem Brot und Mehl (OSBORNE, 1980), gerösteten Kaffeebohnen (TSUBOUCHI et al., 1988), Nüssen aller Art (KIERMEIER, 1985) und in hohen Konzentrationen in Feigen (BAUMANN und ZIMMERLI, 1988) nachgewiesen werden.

2.2.3.3 Citrinin

Trotz der weiten Verbreitung der Citrinin produzierenden Schimmelpilze liegen nur spärliche Berichte über das Vorkommen von Citrinin vor. SCOTT et al. (1972) berichten, daß von 18 mit Ochratoxin A kontaminierten Proben 13 auch Citrinin in einem Bereich von 0,07 bis 80 mg/kg enthielten. Auch KROGH et al. (1973) konnten Citrinin nur gemeinsam mit Ochratoxin A nachweisen. Allerdings enthielten 58% der von ihnen untersuchten Proben Ochratoxin A, hingegen nur 9% auch Citrinin.

2.2.3.4 Trichothecene (T-2 Toxin, Diacetoxyscirpenol, Roridin A)

Hinsichtlich des Vorkommens von T-2 Toxin und DAS, das weltweit beschrieben und auch mit verschiedenen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht wurde (PATHRE und MIROCHA, 1977), seien an dieser Stelle nur die Untersuchungen von GAREIS et al. (1985) erwähnt: in 295 untersuchten Proben aus der BRD konnten in neun Proben massenspektrometrisch Trichothecene nachgewiesen werden; T-2 Toxin lag in drei Proben vor (Maximalwert 100 µg/kg), DAS in zwei Proben (Maximalwert 125 µg/kg); daneben wurden noch Neosolaniol und HT-2 Toxin nachgewiesen. Über einen Untersuchungszeitraum von fünf Jahren konnten in Untersuchungen desselben Institutes in 4,4% der Proben diese Toxine nachgewiesen werden (BAUER, 1987).

2.2.3.5 Zearalenon

Zearalenon gehört zu den weltweit am häufigsten nachgewiesenen Mykotoxinen. Da erst in jüngerer Zeit über das Vorkommen dieses Mykotoxins ausführlich referiert wurde (ENDERS, 1984; KUIPER-GOODMAN et al., 1987; RENZ, 1989) soll hier nicht weiter darauf eingegangen werden.

2.3 Extraktions- und Nachweisverfahren

Das Hauptaugenmerk wird in der folgenden Übersicht im Hinblick auf die eigenen Untersuchungen auf detaillierte Angaben bezüglich der Anwendung enzymimmunologischer Nachweisverfahren gelegt.

In den letzten Jahren wurden vermehrt immunologische Verfahren für den Nachweis von Mykotoxinen entwickelt, wie Radioimmunoassay (RIA) und Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA). Da radioimmunologische Nachweisverfahren zum einen aufgrund verschiedener Nachteile, z.B. Schwierigkeiten bei der Markierung, teure Geräte oder Probleme bei der Abfallbeseitigung, in der praktischen Anwendung eingeschränkt sind, zum anderen eine, im Vergleich zu den ELISA's, umfangreichere Probenaufbereitung erfordern (PESTKA, 1988), zum dritten in den eigenen Untersuchungen nicht eingesetzt wurden, soll in dieser Literaturübersicht nicht ausführlich auf sie eingegangen werden.

Die Entwicklung und Erarbeitung von ELISA's zum Nachweis von Mykotoxinen wurde erst kürzlich in einer am Institut angefertigten Dissertationsarbeit ausführlich dargestellt (MÄRTLBAUER, 1988). Alle bisher beschriebenen ELISA's zum Nachweis von Mykotoxinen stellen heterogene Tests dar, d.h. die Trennung von freiem und an spezifische Antikörper gebundenem Antigen erfolgt durch einen Waschschrift. Desweiteren kommt immer das kompetitive Prinzip zur Anwendung, d.h. freies und an Enzym oder Protein gebundenes Mykotoxin konkurrieren um die Antikörperbindungsstellen. Beim direkten, kompetitiven Verfahren wird die Festkörperphase, d. h. im konkreten Fall Mikrotiterplatten, mit spezifischem Antiserum beschichtet, anschließend konkurrieren Mykotoxin und enzymmarkiertes Mykotoxin um die freien Antikörperbindungsstellen. Beim indirekten, kompetitiven Verfahren hingegen wird die Festkörperphase mit einem Protein-Mykotoxin-Konjugat beschichtet, wonach das zu bestimmende Mykotoxin und das spezifische Antiserum zugegeben werden; in dieser Testanordnung konkurrieren somit freies und proteingebundenes Mykotoxin um die Antikörperbindungsstellen.

Da sowohl Antikörper als auch Enzyme komplexe Proteinstrukturen aufweisen, werden die enzymimmunologischen Nachweise zur Vermeidung von Proteindenaturierungsvorgängen in wäßrigen Lösungen durchgeführt, denen Methanol zu einem gewissen Prozentsatz (meist 10% v/v) als Lösungsvermittler für die Mykotoxine zugesetzt wird.

Flüssige Probenmatrizes, wie Milch und Urin, können direkt oder nach ausreichender Verdünnung mittels ELISA untersucht werden. Feste Probenmatrizes erfordern zuerst eine Extraktion, zu der meist Methanol-Wasser-Gemische verwendet werden. Diese Probenrohextrakte verursachen aber nach Einstellen des Methanolgehaltes auf <10% (v/v) eine unspezifische Störung des Testsystems, behindern also die Antigen-Antikörper-Reaktion. Dies wiederum führt zu falsch positiven Ergebnissen bzw. zu Wiederfindungsraten von über 100%. Es gibt verschiedene Lösungsvorschläge, um dieses Problem der Interferenzen zu umgehen: zum einen den Rohextrakt soweit zu verdünnen, daß die im Extrakt verbliebenen störenden Probenbestandteile sozusagen ausgewaschen werden; zum zweiten die zur Auswertung des Testes notwendige Standardkurve in toxinfreien Rohextrakten anzulegen (und nicht wie üblicherweise in einem wäßrigen Puffer mit < 10% Methanolzusatz); zum dritten die Standards und die Proben in einem Puffer mit einem Methanolzusatz von 35% (v/v) anzulegen, wobei davon ausgegangen wird, daß bei hohen Methanolgehalten keine unspezifische Hemmung des Testsystems auftritt; zum vierten den Rohextrakt säulenchromatographisch oder über Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie aufzureinigen. Literaturangaben sind bei der Besprechung der jeweiligen Mykotoxine aufgeführt.

In dieser Literaturübersicht werden desweiteren häufig verwendete Extraktionsverfahren für den physikalisch-chemischen Nachweis der Mykotoxine, insbesondere für Ochratoxin A und Citrinin angesprochen.

2.3.1 Aflatoxin B₁

Von den vielen Vorschlägen zur Extraktion des AFB₁, seien an dieser Stelle nur die CB- und die BF-Methode genannt: während bei der BF-Methode (WALTKING et al., 1968) der methanolisch-wäßrige Rohextrakt durch Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie (Ausschütteln mit Chloroform) aufgereinigt wird, beinhaltet die CB-Methode (EPPLEY, 1966) eine säulenchromatographische Aufreinigung (Kieselgel-Säule) des mit einem Chloroform-Wasser Gemisch (10+1) gewonnenen Rohextraktes. Mit dieser Methode können neben Erdnüssen und Erdnußprodukten auch andere Probenmatrizes wie Mais extrahiert werden, während die Anwendbarkeit der BF-Methode infolge von häufig auftretenden Emulsionen auf erstere beschränkt ist.

Für den schnellen semiquantitativen Nachweis von AFB₁ wurden Minisäulen entwickelt. Durch aufeinanderfolgende Zonen von verschiedenen Adsorbentien wird AFB₁ von den sonstigen Probenbestandteilen getrennt, reichert sich in einer Schicht an (Florisil) und kann dann unter UV-Licht als blau fluoreszierende Bande detektiert werden (ROMER, 1975). Für den quantitativen Nachweis werden vor allem die Dünnschichtchromatographie (DC) und bisher in geringerem Umfang die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) verwendet. Eine ausführliche Zusammenfassung zu diesen Nachweismethoden geben BETINA (1985) und SHEPHERD (1986).

Auch beim Nachweis von AFB₁ in Erdnüssen, Erdnußbutter, Baumwollsamensamen, Mais und Weizen mittels ELISA wurden mehrere der oben erwähnten Methoden zur Vermeidung unspezifischer Störungen des Testsystems angewandt, insbesondere die Verdünnungsmethode (CHU et al., 1987; MORTIMER et al., 1987b) und die Testdurchführung in Pufferlösungen mit hohen Methanolzusätzen (EL NAKIB et al., 1981; RAM et al., 1986). Bei beiden Methoden traten allerdings erhebliche Standardabweichungen auf (Variationskoeffizienten >20%), was nach CHU et al. (1988) durch einen zusätzlichen Entfettungsschritt verhindert werden kann. Desweiteren traten in den Untersuchungen von MORTIMER et al. (1987b) bei Vergleich der ELISA-Ergebnisse mit einer HPLC-Methode einige falsch positive Ergebnisse

auf. Eine wesentlich bessere Nachweisgrenze als bei den oben erwähnten Autoren wird von BIERMANN und TERPLAN (1982) angegeben, die zur Erhöhung der Empfindlichkeit den methanolischen Rohextrakt einengten.

2.3.2 Aflatoxin M₁

Über den Nachweis von AFM₁ in der Milch wurde erst kürzlich referiert (HEUSEL, 1987). Während der Nachweis von AFM₁ in Käse mittels DC in vielen offiziellen Methoden verankert ist, wird die HPLC erst in den letzten Jahren verstärkt eingesetzt. Der Nachweis mittels ELISA gewinnt in jüngerer Zeit vor allem für die Untersuchung der Milch Bedeutung (MÄRTLBAUER und TERPLAN, 1985); die Anwendung für Milchprodukte hingegen ist bislang nur von FREMY und CHU (1984) beschrieben.

Einige Nachweisverfahren sind in Tab. 7 aufgeführt. Unabhängig vom Nachweissystem wird von allen Autoren eine säulenchromatographische Aufreinigung des Extraktes durchgeführt. Neue Möglichkeiten der Extraktaufreinigung sind durch die Entwicklung von Affinitätschromatographie-Säulen gegeben, die jedoch bisher nur für die Aufreinigung von Milch und Milchpulver eingesetzt wurden (MORTIMER et al., 1987a)

2.3.3 Ochratoxin A

Die Extraktion von Ochratoxin A - dies gilt auch für Citrinin - aus verschiedenen Probenmatrizes wird dadurch erleichtert, daß beide Toxine eine Carboxylgruppe enthalten und deswegen pH-abhängig sowohl in wäßrigen Lösungen als auch in organischen Lösungsmitteln löslich sind.

Zur Extraktion von Ochratoxin A werden verschiedene Lösungsmittel und deren Kombinationen verwendet, wie Methanol-Wasser, Chloroform-Methanol und Mischungen von organischen Lösungsmittel mit verdünnter Phosphorsäure.

Tabelle 7: Nachweismethoden für Aflatoxin M₁ im Käse

	STUBBLEFIELD (1979b)	HISADA et al. (1984)	FREMY und CHU (1984)	BIJL et al. (1987)
Extraktions- lösung	Chloroform	Chloroform	Dichlormethan	Aceton/Wasser (3+1)
Aufreinigung	Kieselgel-Säule	2 Kieselgel-Säulen Sep-pak C ₁₈ - Kartusche	Sep-pak-Silicia Kartusche	Sep-pak C ₁₈ - Kartusche
Nachweis- methode	DC	HPLC	ELISA	Sep-pak-Silicia Kartusche
grenze (ng/kg)	100	10	25-50	DC oder HPLC 10
Wiederfindungs- raten	-	> 90%	64-101%	> 90%

Vor dem Nachweis von Ochratoxin A mittels DC oder HPLC erfolgt üblicherweise eine säulenchromatographische Aufreinigung des Rohextraktes. Dazu werden Kieselgel-Säulen (NESHEIM et al., 1973; JOSEFSSON und MÖLLER, 1979; BAUER und GAREIS, 1987), Sep-pak C₁₈ Kartuschen (TERADA et al., 1986), Sep-pak Silicia Kartuschen (ROBERTS et al., 1981), mit Oxalsäure imprägnierte Kieselgel-Säulen (SCOTT et al., 1971) oder Extrelut-Säulen (BAUMANN und ZIMMERLI, 1988) verwendet, wobei meist noch eine weitere Aufreinigung der Säuleneluate zum Beispiel durch Ausschütteln mit alkalischen Natriumbicarbonatlösungen erforderlich ist. Bei der von NOWOTNY et al. (1983b) vorgeschlagenen Extraktionsmethode wurde zwar auf eine säulenchromatographische Aufreinigung verzichtet, es traten aber falsche positive Ergebnisse auf. In einer neueren Arbeit wird zur Einsparung von Lösungsmitteln eine Extraktaufreinigung durch reversed-phase DC mit anschließender HPLC-Analyse vorgeschlagen (FROHLICH et al., 1988).

HULT und GATENBECK (1976) entwickelten eine Nachweismethode, die auf der Änderung der Fluoreszenzspektren nach Spaltung von Ochratoxin A durch Carboxypeptidase A beruht. Ein semiquantitatives Nachweisverfahren unter Verwendung einer mit Kieselgel gefüllten Minisäule wurde von HALD und KROGH (1975) vorgestellt. Eine Übersicht der physikalisch-chemischen Verfahren für den Nachweis von Ochratoxin A in Lebens- und Futtermittel gibt Tab. 8.

Bei immunologischen Nachweisverfahren kann dagegen auf eine säulenchromatographische Aufreinigung verzichtet werden; in den bisher vorliegenden Arbeiten erwies sich bei der Gerste eine einfache Aufreinigung des Rohextraktes durch Flüssig-Flüssig Verteilung als ausreichend (CANDLISH et al., 1988; MORGAN et al., 1983). LEE und CHU (1984) hingegen verwendeten bei der Aufreinigung von Weizenrohextrakten zur Vermeidung einer unspezifischen Störung des Testsystems Sep-pak C₁₈ Kartuschen. ROUSSEAU et al. (1985) verglichen drei verschiedene Aufbereitungsmethoden für Gerste. Bei den von ihnen verwendeten RIA erwies sich weder die AOAC-Methode, die auf der Arbeit von NESHEIM et al. (1973) basiert, noch eine Aufreinigung durch Flüssig-Flüssig Verteilung als ausreichend, wobei jedoch die in den RIA eingesetzten End-

extrakte jeweils 10 g Probe entsprachen. Zufriedenstellende Ergebnisse wurden von diesen Autoren mit einer Aufreinigung über eine Extrelut-Säule erzielt.

Bei der Untersuchung von Lebensmitteln tierischer Herkunft sind, wie bereits oben angesprochen, vor allem Rückstände bei Schweinen insbesondere im Plasma und in der Niere zu erwarten. Die Affinität des Ochratoxin A zu Serumproteinen macht bei der Aufarbeitung tierischer Lebensmittel eine Ansäuerung des Probenmaterials unumgänglich, um das proteingebundene Toxin freizusetzen (GAREIS et al., 1988). Für die Extraktion der Niere werden daher meist Mischungen von Chloroform und Säuren verwendet (KROGH et al., 1974; BAUER et al., 1984). Der erhaltene Rohextrakt wird dann über Kieselgel-Säulen oder durch mehrmaliges Ausschütteln mit Natriumbicarbonatlösungen weiter aufgereinigt. HUNT et al. (1979) schlagen dagegen zum Freisetzen des proteingebundenen Anteils einen enzymatischen Aufschluß der Nierenmatrix bei gleichzeitiger Dialyse gegen eine alkalische Methanol-Wasser Mischung vor.

Die von ROUSSEAU et al. (1987) beschriebene Extraktionsmethode für den Nachweis von Ochratoxin A in der Niere mittels eines RIA umfaßt folgende Schritte: Gewinnung des Rohextraktes mit Chloroform nach Ansäuerung der Probe mit Phosphorsäure, Ausschütteln mit Natriumhydrogencarbonatlösung, Aufreinigung über eine Sep-pak C₁₈ Kartusche, Eindampfen des Eluates, eine weitere säulenchromatographische Aufreinigung über eine Sep-pak Silicia Kartusche und nochmaliges Eindampfen des Eluates. Die Nachweisgrenze beträgt für dieses Verfahren 0,2 µg/kg, die Wiederfindungsraten liegen zwischen 70,3 und 77,7%. Bei der von MORGAN et al. (1986) vorgeschlagenen Aufbereitungsmethode zum Nachweis mittels eines indirekten ELISA wird dagegen der Chloroformrohextrakt nur mit Natriumbicarbonat-30% Methanol ausgeschüttelt. Aliquote der wäßrigen Phase werden dann in den ELISA eingesetzt. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,5 - 1 µg/kg. Erst kürzlich beschrieben MÄRTL-BAUER und TERPLAN (1988) ein enzymimmunologisches Nachweisverfahren für Ochratoxin A in Schweineseren, bei dem ebenfalls auf eine säulenchromatographische Aufreinigung verzichtet werden kann.

Tabelle 8: Physikalisch-chemische Nachweisverfahren für Ochra-
toxin A in Lebens- und Futtermitteln pflanzlichen
Ursprungs (Fortsetzung der Tabelle Seite 34)

EXTRAKTIONSMITTEL	AUFREINIGUNG	
	1.Schritt	2.Schritt
$\text{CHCl}_3\text{-HCl}$	Kieselgel-Säule (mit Oxalsäure imprägniert)	Flüssig-Flüssig
$\text{CHCl}_3\text{-0,1 M H}_3\text{PO}_4$	Kieselgur-Säule (in NaHCO_3 aufgeschwemmt)	-
$\text{CHCl}_3\text{-0,1 M H}_3\text{PO}_4$	Flüssig-Flüssig	-
$\text{CHCl}_3\text{-0,1 M H}_3\text{PO}_4$	Flüssig-Flüssig	Flüssig-Flüssig
$\text{CHCl}_3\text{-0,1 M H}_3\text{PO}_4$	Kieselgel 60 Säule	Kieselgur-Säule
$\text{CHCl}_3\text{-H}_2\text{O}$	Sep-pak Silicia Kartusche	-
Methanol- H_3PO_4	Carrez-Fällung Entfetten mit Hexan	Ausschütteln mit Dichlormethan
$\text{CHCl}_3\text{-Äthanol-5\% Essigsäure}$	Sep-pak Silicia Kartusche	Cyano Kartusche
Methanol-1% Natrium-bicarbonatlösung	Flüssig-Flüssig	Sep-pak C_{18} Kartusche; Flüssig-Flüssig
CHCl_3	Kieselgel-Säule	Flüssig-Flüssig
$\text{CHCl}_3\text{-0,1 M H}_3\text{PO}_4$	Extrelut-Säule	-
$\text{CHCl}_3\text{-H}_3\text{PO}_4$	reversed-phase DC	-

Abkürzungen:

CHCl_3 = Chloroform

k.A. = keine Angaben

F = Fluoreszenzmessung

H_3PO_4 = Phosphorsäure

W = Wiederfindungsrate

Fortsetzung Tab. 8:

PROBEN	NACHWEIS- SYSTEM	GRENZE	W (%)	REFERENZ
Kulturmedium	DC	-	-	SCOTT et al. (1971)
Gerste	DC	12 µg/kg	81,2	NESHEIM et al. (1973)
Hafer, Gerste	F	12 µg/kg	-	HALD und KROGH (1975)
Gerste	F	4 µg/kg	ca.90	HULT und GATENBECK (1976)
Zerealien	HPLC	1-5 µg/kg	75,1-92,3	JOSEFSSON und MÖLLER (1979)
Zerealien, Futtermittel	DC	20 µg/kg	k.A.	ROBERTS et al. (1981)
Weizenkleie	HPLC	5 µg/kg	70-90	NOWOTNY et al. (1983b)
Zerealien, Futtermittel	HPLC	5 µg/kg	90,6	COHEN und LAPOINTE (1986)
Kaffee, -bohnen	HPLC	0,2-5 µg/kg	> 80	TERADA et al. (1986)
Zerealien, Futtermittel	HPLC	0,1 µg/kg	20	BAUER und GAREIS (1987)
Lebensmittel	HPLC	0,1 µg/kg	> 80	BAUMANN und ZIMMERLI (1988)
Gerste	F, HPLC	100 µg/kg	> 80	FROHLICH et al. (1988)

2.3.4 Citrinin

Für die Extraktion von Citrinin, das ebenfalls eine Carboxylgruppe enthält, werden auf pH 2-3 angesäuerte Chloroform-Wasser Mischungen (HALD und KROGH, 1973; JACKSON und CIEGLER, 1978; DICK et al., 1988) bzw. Acetonitril unter Zusatz von Kaliumchlorid und Schwefelsäure (MARTI et al., 1978) oder einem Zusatz von Glycolsäure (GIMENO, 1984) verwendet. TRANTHAM und WILSON (1984) schlugen bei Verwendung von Acetonitril die zusätzliche Zugabe von $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ vor, um so die Wiederfindungsraten von Citrinin - unter Ausnutzen dessen chelatkomplexbildenden Eigenschaften - zu steigern. Nach Untersuchungen von GIMENO (1984) können die Wiederfindungsraten für Citrinin in nur gering kontaminierten Proben um etwa 20% gesteigert werden, wenn der Zusatz von 4%iger KCl-Lösung zum Acetonitril durch die Zugabe von 10%iger Glycolsäurelösung ersetzt wird. CHALAM und STAHR (1979) extrahierten dagegen Citrinin mit einem Methanol-Wasser Gemisch (30:70). Die weitere Aufreinigung der mit den vorgestellten Methoden gewonnenen Rohextrakte erfolgte meist mit einer Flüssig-Flüssig Verteilung. Eine säulenchromatographische Aufreinigung wird von DICK et al. (1988) beschrieben. Sie verwendeten dazu Extrelut-Säulen. Die gleiche Extraktionsmethode wurde von BAUMANN und ZIMMERLI (1988) für den Nachweis von Ochratoxin A in Lebensmitteln benutzt. Angaben über Nachweisgrenzen und die jeweiligen Nachweismethoden enthält Tab. 9.

Enzymimmunologische Nachweismethoden für Citrinin sind bislang nicht beschrieben.

Über den Nachweis von Citrinin in biologischen Flüssigkeiten mittels "reversed-phase" HPLC gibt es Arbeiten von PHILLIPS et al. (1980), der als stationäre Phase eine C_{18} Säule mit einem Porendurchmesser von 10 μm und als Laufmittel 0,25 n H_3PO_4 - Acetonitril - 2-Propanol (55:35:10) verwendete, und von DUNN et al. (1983), der bei gleicher Säule als Laufmittel Methanol - 0,25 n H_3PO_4 - Ethylacetat (55:40:5) benutzte. Die Retentionszeiten lagen bei 4,2 bzw. 6,2 min.

Tabelle 9: Nachweismethoden für Citrinin

PROBEN	NACHWEIS- SYSTEM	GRENZE	W (%)	REFERENZ
Gerste	DC	200 µg/kg	84-98%	HALD und KROGH (1973)
Mais, Gerste	DC, HPLC ¹	50 µg/kg	65,2-75,5	MARTI et al. (1978)
Zerealien, Futtermittel	DC	500 µg/kg	77-92	CHALAM und STAHR (1979)
Mais, Gerste, Erdnüsse	F	100 µg/kg	40,0-66,6	TRANHAM und WILSON (1984)
Zerealien, Lebensmittel	HPLC ²	0,1 µg/kg	77,1-98,2	DICK et al. (1988)

1) "reversed-phase"

2) "normal-phase"

Abkürzungen siehe Tab. 8

Beim Nachweis von Citrinin mit physikalisch-chemischen Methoden treten einige Probleme auf. So ist es nötig beim Nachweis mittels DC die Kieselgelplatten mit Oxalsäure oder Glycolsäure zu imprägnieren, da ansonsten Citrinin sich nicht als auswertbarer Spot darstellt (GIMENO, 1984). STUBBLEFIELD (1979a) schlug zur Vermeidung dieser Schwierigkeiten vor, bei der Dünnschichtplattenherstellung Na₂-EDTA unter das Kieselgel zu mischen. Bei der "normal-phase" HPLC dagegen ist es nötig, gepufferte Silicia-Gel Säulen zu verwenden, da sich Citrinin ansonsten irreversibel an das Säulenmaterial bindet. DICK et al. (1988) verwendeten dazu eine 0,2 molare Citronensäurelösung. Bei der "reversed-phase" HPLC muß das verwendete Laufmittel auf pH Werte von 2-3 angesäuert werden, um die Dissoziation der Carboxylgruppe des Citrinins und daraus resultierende Effekte wie Doppelpeaks und Tailing zu verhindern (LEPOM, 1986).

2.3.5 Gemeinsamer Nachweis von Citrinin und Ochratoxin A

Obwohl, wie bereits oben erwähnt, das gemeinsame Vorkommen von Ochratoxin A und Citrinin beschrieben ist, gibt es nur wenige Arbeiten, abgesehen von Multimykotoxinmethoden, über die gleichzeitige Bestimmung dieser beiden Toxine mittels HPLC. LEFOM (1986) stellte in Anlehnung an die Arbeiten von PHILLIPS et al. (1980) und MARTI et al. (1978) eine "reversed-phase" HPLC Methode zur gleichzeitigen Bestimmung beider Toxine in Weizen und Gerste vor; die Extraktion erfolgte dabei nach MARTI et al. (1978), die Nachweisgrenzen betrugen 10 µg/kg für Citrinin bzw. 40 µg/kg für Ochratoxin A. Die Arbeiten von DICK et al. (1988) beziehungsweise BAUMANN und ZIMMERLI (1988) beruhen zwar auf der gleichen Extraktionsmethode, der Nachweis von Ochratoxin A erfolgt aber mit einer "reversed-phase" HPLC, der Citrinin-Nachweis dagegen mittels "normal-phase" HPLC mit Fluoreszenzdetektion.

2.3.6 Trichothecene (T-2 Toxin, Diacetoxyscirpenol, Roridin A)

Biologische Nachweisverfahren wie Hauttoxizitätstest, Artemia salina Test oder Zellkulturtest sind vielfach beschrieben; PATHRE und MIROCHA (1977) und GAREIS (1982) geben hierzu Übersichten. Neben diesen unspezifischen Nachweisverfahren werden vor allem DC, HPLC, Gaschromatographie (GC) und GC mit Kopplung an einen Massenspektrometer (GC-MS) verwendet. Da die physikalisch-chemischen Nachweisverfahren für diese Arbeit nur von untergeordnetem Interesse sind, soll hier nicht weiter darauf eingegangen werden. Eine ausführliche Zusammenfassung der physikalisch-chemischen Nachweisverfahren gibt UENO (1983); die DC-Nachweismethoden sind auch bei BETINA (1985) umfassend dargestellt, die Anwendung der GC zum Nachweis der Trichothecene bei BEAVER (1986).

Alle diese Nachweismethoden erfordern bei der Untersuchung von Zerealien und Futtermitteln eine umfassende Aufreinigung des Rohextraktes. Eine ausführliche Beschreibung der Extraktions- und Reinigungsverfahren gibt EPPLEY (1979). Zur Extraktion werden

meist Methanol-Wasser-Gemische verwendet (UENO, 1983). Die weitere Aufreinigung erfolgt dann durch Ausschütteln des Rohextraktes mit chlorierten Kohlenwasserstoffen und anschließender Säulenchromatographie. Verwendet werden hierzu beispielsweise Kieselgel-Säulen (ROMER et al., 1978), Sep-pak C₁₈-Kartuschen (SCHMIDT et al., 1981) oder Extrelut 20 Säulen (SYDENHAM und THIEL, 1987). In einer neueren Arbeit zum Nachweis von T-2 Toxin, DAS und anderen Trichothecen, wie Deoxynivalenol, HT-2 Toxin, wird der Acetonitril-Rohextrakt über eine Aktivkohle-Aluminium-Kieselgur-Säule vorgereinigt und dann noch über eine Florisil-Säule (entspricht einer Kieselgel-Säule mit 15% Magnesiumanteil) und eine Kieselgel-Säule gegeben (ROOD et al., 1988).

Bei der Anwendung von enzymimmunologischen Nachweisverfahren vereinfacht sich diese Probenaufbereitung oder entfällt ganz.

Für den Nachweis von DAS in Zerealien mittels ELISA wurden verschiedene Extraktionsmittel angewandt. Während SCHUBRING und CHU (1987) DAS aus Mais und Weizen mit Aceton extrahierten, verwendeten KLAFFER (1988) und MILLS et al. (1988) Methanol für die Extraktion aus Zerealien bzw. Weizen. Zur weiteren Aufreinigung verwendeten SCHUBRING und CHU (1988) eine Sep-pak C₁₈ Kartusche. Trotz dieser säulenchromatographischen Aufreinigung war noch eine unspezifische Beeinflussung des Testsystems zu beobachten, so daß von diesen Autoren vorgeschlagen wurde, die Standardkurve in Extrakten einer ebenfalls über eine Sep-pak C₁₈ Kartusche vorgereinigten DAS-negativen Weizenprobe anzulegen. Die Nachweisgrenze lag bei 5 µg/kg. MILLS et al. (1988) nahmen dagegen keine weitere Aufreinigung des Rohextraktes vor, sondern versuchten, indem sie den Rohextrakt in sehr hohen Verdünnungsstufen (> 1:1000) in den Elisa einsetzten, das Problem der Interferenzen zu umgehen. KLAFFER (1988) verglich verschiedene Aufbereitungsmethoden: er erzielte die höchsten Wiederfindungsraten bei Verwendung von Methanol, beobachtete aber vor allem bei Hafer ebenfalls beträchtliche unspezifische Störungen; desweiteren traten nicht mehr akzeptable Schwankungen bei Parallelansätzen der gleichen

Probe von über 25% auf. Für die Anwendung von ELISA's zum Nachweis von T-2 Toxin in Weizen und Mais liegen ähnliche Angaben vor. PESTKA et al. (1981) untersuchten die Einflüsse von methanolischen Weizen- und Maisextrakten auf das Testsystem. Ohne Probenaufbereitung wurden in den mit 2,5 ng/g künstlich kontaminierten Proben Wiederfindungsraten von 122% (Weizen) bzw. 217% (Mais) ermittelt; die Variationskoeffizienten der Wiederfindungsraten lagen bei über 30%. Bei Aufreinigung der Extrakte mit einer Sep-pak C₁₈ Kartusche konnten zwar bei Weizenextrakten diese Interferenzen beseitigt werden, die Variationskoeffizienten lagen aber immer noch über 20%. GENDLOFF et al. (1984) halten dagegen für Mais keine Probenaufbereitung für nötig. Auch ESGIN (1987) setzte Mais- und Weizenextrakte ohne weitere Aufbereitung in den ELISA ein; Hafer- und Gersteextrakten allerdings erforderten nach seinen Untersuchungen eine Aufreinigung über eine Sep-pak C₁₈ Kartusche. In einer neueren Arbeit (CHIBA et al., 1988) wird der Einfluß von Weizenextrakten (in Acetonitril-Wasser 50:50) auf den ELISA nach verschiedenen Aufbereitungsmethoden untersucht. Nach Entfetten des Rohextraktes trat noch eine unspezifische Hemmung des Testsystems auf, die durch ein Ausschütteln des Extraktes mit Chloroform verringert werden konnte. Trotzdem lagen die Wiederfindungsraten in künstlich kontaminierten Proben noch über 100%.

Über den Nachweis von T-2 Toxin und DAS in Mischfuttermitteln mittels ELISA liegen keine Angaben vor.

Ein ELISA zum Nachweis von Roridin A wurde am Institut entwickelt und erst kürzlich beschrieben (MÄRTLBAUER et al., 1988); Angaben über die Anwendung in Lebens- und Futtermittel liegen bisher nicht vor.

2.3.7 Zearalenon

Für den physikalisch-chemischen Nachweis von Zearalenon wird vor allem die DC und HPLC verwendet, während GC-Methoden nur selten eingesetzt werden. Über diese Nachweismethoden wurde erst kürzlich in einer am Institut erstellten Dissertationsarbeit aus-

fürhlich referiert (RENZ, 1989). Verwiesen sei in diesem Zusammenhang auch noch auf BETINA (1984).

Bei der Anwendung von enzymimmunologischen Nachweisverfahren wurden, wie schon bei AFB₁ erwähnt, ebenfalls mehrere Vorschläge zur Vermeidung unspezifischer Störungen des Testsystems gemacht: WARNER et al. (1986) extrahierten Mais mit Methanol:PBS:Dimethylformamid (70:29:1) und setzten den Rohextrakt ohne weitere Aufreinigung in den ELISA ein (Testdurchführung in PBS mit 35% Methanolzusatz); die Wiederfindungsraten betrugen bis zu 131%, die Nachweisgrenze lag bei 50 µg/kg. WARNER und PESTKA (1987) untersuchten zerealienhaltige Futtermittel und gaben bei gleicher Testdurchführung wie oben als Nachweisgrenze 2,5 µg/kg an. RENZ (1989) verwendete Sep-pak C₁₈ Kartuschen zur Extraktaufreinigung von Zerealien und Mischfuttermittel; die Nachweisgrenze lag bei (20 µg/kg). Als weniger zeitaufwendige und materialersparende Methodenalternative schlug er vor, die Rohextrakte in hohen Verdünnungen ohne weitere Aufreinigung in den ELISA einzusetzen; die Nachweisgrenze lag dann bei 50 µg/kg.

2.3.8 Multimykotoxin-Methoden

Da zum einen verschiedene Pilze die Fähigkeit besitzen, mehrere Toxine gleichzeitig zu bilden, zum anderen Lebens- und Futtermittel meist von mehreren Pilzarten besiedelt sind, wurden verschiedene Multimykotoxin-Methoden zur zeit- und materialsparenden, gleichzeitigen Extraktion und zum simultanen Nachweis von mehreren Mykotoxinen entwickelt. Als Nachweissystem wird meist die DC verwendet, da damit neben den fluoreszierenden Toxinen wie Aflatoxine, Ochratoxin A, Citrinin, Zearalenon und anderen, auch Toxine wie T-2 Toxin und DAS bei Verwendung geeigneter Sprühreagentien oder Toxine wie Roridin A unter Ausnutzen der fluoreszenzlöschenden Eigenschaften (bei Verwendung von DC-Platten mit Fluoreszenzindikator) nachgewiesen werden können. Bei Verwendung der HPLC als Nachweismethode ist dagegen mit der Wahl des Detektors die Nachweismöglichkeit limitiert. Die Verwendung der GC schließlich beschränkt sich meist auf den Nachweis der Trichothecene.

In der Tab. 10 sind einige Methoden, deren Anwendbarkeit für Ze-realien und Mischfuttermittel beschrieben ist, vor allem unter dem Aspekt der Extraktion und Aufbereitung dargestellt. Die entsprechenden Toxine sowie die Nachweisgrenzen sind in Tab. 11 aufgeführt. Einzelheiten der säulenchromatographischen Aufreinigung und der Nachweismethodik, wie Laufmittel und zur Sichtbarmachung bzw. zur Bestätigung verwendete Sprühreagentien sind im Rahmen dieser Arbeit nicht von Interesse und können den jeweils zitierten Veröffentlichungen entnommen werden. Bei einigen der Methoden, wie bei der Methode nach EPPLEY (1968), wurde der DC-Nachweis nach entsprechender Modifikation durch einen HPLC-Nachweis ersetzt.

Wie der Tab. 11 entnommen werden kann, ist bei fast allen dieser Methoden die geringe Sensivität ein entscheidender Nachteil, insbesondere beim DC-Nachweis der Trichothecene.

Tabelle 10: Extraktion und Aufbereitung bei einigen Multimyko-
toxin Nachweismethoden (die entsprechenden Toxine
sowie die Nachweisgrenzen sind in Tab.11 angegeben)

Extraktion und Aufbereitung	Proben- matrix	Referenz
Chloroform-Wasser (10+1)	Weizen, Mais, Gerste, u.a.	EPPLEY (1968)
Kieselgel-Säule (sequentielle Elution)		(1)
Acetonitril-Wasser (9+1)	Mais	BALZER et al. (1978)
Entfetten mit Hexan		(2)
Flüssig-Flüssig		
Flüssig-Flüssig		
Methanol-Chloroform (1+1)	Mais	GORST-ALLMAN und STEYN (1979)
Entfetten mit Hexan		(3)
Flüssig-Flüssig		
Acetonitril-4% Kaliumchlorid (9+1)	Mais, Weizen, Gerste, Mischfutter- mittel	PATTERSON und ROBERTS (1979)
Entfetten mit Isooctan		(4)
Flüssig-Flüssig		
Dialyse		

Fortsetzung Tabelle 10:

Extraktion und Aufbereitung	Proben- matrix	Referenz
Acetonitril-4% Kaliumchlorid- 20% Schwefelsäure (178+20+2)	Mais, Weizen	TAKEDA et al. (1979)
Entfetten mit Isooctan		(5)
Flüssig-Flüssig		
Kieselgel-Säule		
Methanol-Wasser (95+5)	Zerealien, Lebensmittel	KAMIMURA et al. (1981)
Amberlite-XAD-4-Säule		(6)
Florisil-Säule		
1.) Ethylacetat	Mais,	BATA et al.
2.) Methanol-Wasser (6+4)	Mischfutter- mittel	(1983)
Kieselgel-Säule		(7)
Methanol	Lebensmittel, NOWOTNY et al.	
Entfetten mit Hexan	Mais, Käse	(1983a)
Ausschütteln mit Dichlor- methan		(8)

Tabelle 11: Nachweisgrenzen einiger Multimykotoxinmethoden (in µg/kg)
(siehe auch Tab. 10)

Referenz ¹⁾	1 ²⁾	2	3	4	5	6	7	8
Nachweis		DC	DC	DC	DC	GC	GC	DC ³⁾
-methode:		DC	DC	DC	DC	GC	GC	
-grenze für:								
AFB ₁	30	2	10	0,1-0,3 k.A. ⁴⁾	10			5
Citrinin			100		80-200			200
Ochratoxin A	50	40	10	5-10	40-60			50
DAS					800	80	100	4000
T-2 Toxin			1000	200	300-500	80	100	4000
Roridin A			100					800
Zearalenon	500	200	1000	20-100	300-500	10-50 ⁵⁾	100	1000

- 1) die Nummern entsprechen den Angaben in Tab. 10
- 2) nach Modifikation Nachweisgrenze für AFB₁ 1-2 µg/kg
und für Zearalenon 50-100 µg/kg
- 3) für manche Toxine auch mit HPLC-Nachweis
- 4) keine Angaben
- 5) mit DC bestimmt

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Materialien, Geräte und Methodik

3.1.1 Chemikalien und Biochemika

Fetales Kälberserum (Sigma Chemie GmbH, F 4010)
Protease (Sigma Chemie GmbH, P 5380)
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (Sigma Chemie GmbH, T 2885)
Tween 20 (Sigma Chemie GmbH, P 1359)

Alle weiteren nicht eigens aufgeführten Reagenzien und Lösungsmittel wurden von der Firma Merck in der Reinheitsstufe p.A., soweit nicht anders angegeben, bezogen.

3.1.2 Puffer und Lösungen

0,05 mol/l Bicarbonatpuffer (pH 9,6)
0,01 mol/l Phosphatpuffer (PBS), (mit 0,12 mol/l NaCl, pH 7,3)
3% FKS/PBS (3% fetales Kälberserum in PBS)
1% FKS/PBS (1% fetales Kälberserum in PBS)
PBS mit 10% Methanolzusatz
PBS mit 0,1% Tween 20 Zusatz

0,13 mol/l Natriumbicarbonatlösung (NaHCO_3)
Waschlösung (0,15 mol/l NaCl mit 0,25% Tween 20-Zusatz)

0,21 mol/l Citratpuffer (mit 3,15 mmol/l H_2O_2 , pH 3,9)
Tetramethylbenzidinlösung (1 mmol 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
in 5ml Aceton und 45 ml Methanol)
Substratlösung (nach GALLATI und PRACHT, 1985):
20 Teile Citratpuffer (mit H_2O_2) + 1 Teil Tetramethylbenzidin-
lösung

3.1.3 Mykotoxine

Die Mykotoxine Aflatoxin B_1 , Aflatoxin M_1 , Citrinin, Diacetoxyscirpenol, Ochratoxin A, T-2 Toxin, Roridin A und Zearalenon wurden von der Firma Sigma Chemie GmbH bezogen.

3.1.4 Geräte

Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Pumpe: Modell 6000 A (Waters GmbH)
Injektor: Modell U6 K (Waters GmbH)
Säule: 250 mm x 5 mm Spherisorb 5 µm ODS
(Kontron Analytik)
Fluoreszenzdetektor: Modell RF-530 (Shimadzu GmbH)
Integrator: Modell C-R3A (Shimadzu GmbH)

Enzymimmunoassays

Variable Pipetten: 10-100 µl und 100-1000 µl
(Eppendorf Gerätebau GmbH)
Variable 12-Kanalpipette: 50-250 µl (Flow GmbH)
Mikrotiterplatten (Immuno Plate I, Nunc GmbH)
Mikrotiterplattentaumelgerät (Heidolph GmbH)
Mikrotiterplattenlesegerät (ELISA-Autoreader MR 580, Dynatech)
Datenverarbeitung: Computer HP 85B (Hewlett Packard GmbH)
Software: wurde von MÄRTLBAUER (1988) entwickelt und
dankenswerterweise zur Verfügung gestellt

Extraktion

Blockmagnetrührer: Modell EOA 9 mit Steuereinheit ES5 (IKA-Werk)
Kühlzentrifuge: Varifuge RF (Heraeus)
Magnetrührer: Combimag RCH (IKA-Werk)
Rotationsverdampfer: Modell VV 2001 (Heidolph)
Stomacher (Colworth Stomacher 80)
Vortex Genie 2 (Bender & Hobein)

Zum Eindampfen von Dichlormethan wurde eine selbstentwickelte Apparatur verwendet, die in Abb. 9 schematisch dargestellt ist. Der in Dichlormethan gelöste Extrakt, der sich in mit Gummi-stopfen verschlossenen Glasröhrchen befindet, wird im Wasserbad auf ca. 60 °C erhitzt. Die dampfförmige Dichlormethanphase wird dann unter Vakuum - durch eine Wasserstrahlpumpe erzeugt - über

Teflonschläuche, an die beidseitig Injektionskanülen mittels eines Zweikomponentenklebers befestigt sind, in einen Sammelbehälter gesaugt. Mit dieser einfachen Apparatur ist es möglich, 10-20 Proben verlustfrei und gleichzeitig einzudampfen.

Sonstiges

Labormixer: Modell 32BL79 (Waring)

Membranfilter mit 0,22 µm Porendurchmesser (Millipore)

Mikrokonzentrator: Centricon 10 (Amicon GmbH)

Moulinette S (Moulinex)

Spektralphotometer: Modell UV160 (Shimadzu GmbH)

Sep-pak C₁₈ Kartuschen (Waters GmbH)

Sep-pak Silicia Kartuschen (Waters GmbH)

3.1.5 Immunoreagenzien

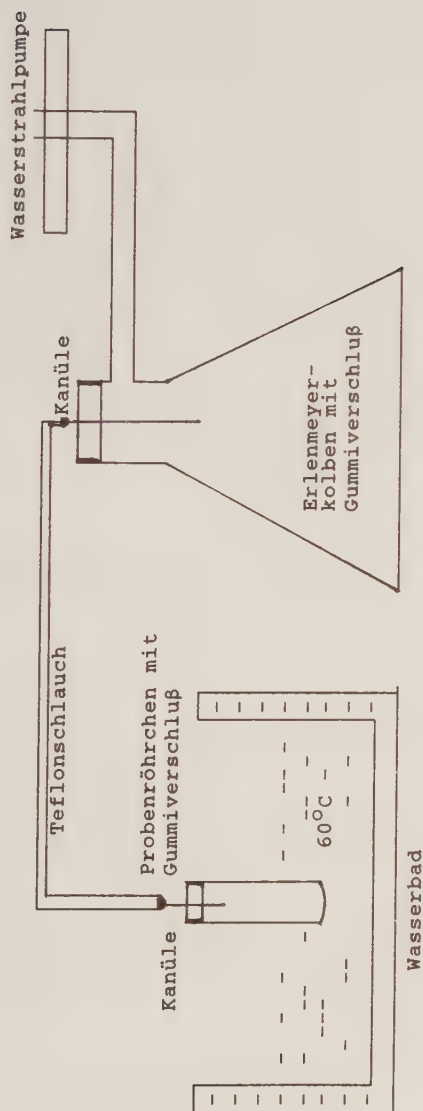
Die Antiseren gegen AFB₁, AFM₁, Ochratoxin A, Zearalenon und Rodridin A, sowie die entsprechenden Toxin-Enzym-Konjugate wurden am Institut entwickelt und standen für die Durchführung der eigenen Untersuchungen zur Verfügung. Im Folgenden werden deshalb nur die zum Verständnis wichtigen Daten bezüglich Herstellung und Charakterisierung dieser Immunoreagenzien sowie die Testdurchführung besprochen. Weitergehende Informationen können den jeweils zitierten Originalarbeiten entnommen werden.

Herstellung der Antiseren

Da Mykotoxine als Haptene nicht immunogen sind, müssen sie an ein Trägerprotein gekoppelt werden. Mit Ausnahme des Ochratoxin A besitzen die übrigen hier vorgestellten Toxine keine reaktive Gruppe, die zur direkten Kopplung an ein Protein verwendet werden könnte, so daß sie vorher derivatisiert werden müssen. Dies geschah auf unterschiedliche Art und Weise.

Durch die Reaktion mit Carboxymethoxylamin wurden die Carbonylgruppen des Aflatoxin B₁, Aflatoxin M₁ und Zearalenon zu Carbo-

Abbildung 9: Schematische Darstellung einer selbstentwickelten Apparatur zum Abdampfen von Dichlormethan (Erläuterung siehe Seite 46)



xylgruppen umgesetzt (BIERMANN und TERPLAN, 1980; MÄRTLBAUER und TERPLAN, 1985; RENZ, 1989). Die Hydroxygruppen von T-2 Toxin und Roridin A wurden mit Bernsteinsäureanhydrid zu einem Hemisuccinat bzw. Dihemisuccinat derivatisiert (ESGIN, 1987; MÄRTLBAUER et al., 1988), die Hydroxygruppe von DAS dagegen mit Glutarsäureanhydrid zu einem Hemiglutarat (KLÄFFER et al., 1988). Diese Derivatisierungsprodukte wurden dann mit verschiedenen Methoden an Humanserumalbumin zur Herstellung eines immunogen wirksamen Toxin-Protein-Konjugates gekoppelt. Bei Aflatoxin M₁-Oxim, T-2 Toxin-Hemisuccinat und DAS-Hemiglutarat kam die Carbodiimidmethode zur Anwendung. Aflatoxin B₁-Oxim und Ochratoxin A, das schon in Form einer Carboxylgruppe eine reaktive Gruppe besitzt, wurden mit der gemischten Anhydridmethode an das Protein gekoppelt (MÄRTLBAUER, 1988). Bei Roridin A-Hemisuccinat und Zearalenon-Oxim wurde zur Kopplung die aktive Estermethode verwendet. Mit den so hergestellten Toxin-Protein-Konjugaten wurden Kaninchen immunisiert und die entsprechenden Antiseren gewonnen.

Herstellung der Toxin-Enzym-Konjugate

Zur Erstellung eines direkten, kompetitiven Enzymimmotestes werden neben spezifischen Antikörpern auch die entsprechenden Toxin-Enzym-Konjugate benötigt. Als Enzym wurde Meerrettichperoxidase (HRP) verwendet. Wird für die Herstellung des Immunogens und des enzymmarkierten Toxins das gleiche Toxin-derivat verwendet, spricht man von homologen Verfahren. Zur Steigerung der Empfindlichkeit von enzymimmunologischen Nachweisverfahren wird öfters eine heterologe Kombination angewandt, d.h. zur Synthese des Enzymkonjugates wird ein anderes Toxin oder ein anderes Derivatisierungsreagenz verwendet. Auf diesem heterologen Verfahren basieren die ELISA zum Nachweis von Aflatoxin M₁, T-2 Toxin, Roridin A und DAS. Die entsprechenden Enzymkonjugate sind Aflatoxin B₁-HRP, HT-2 Toxin-HRP, Verrucaridin A-HRP und DAS-HS-HRP (als Derivatisierungsprodukt wurde ein Hemisuccinat hergestellt).

Aflatoxin B₁ und Zearalenon wurden wie oben beschrieben zu Oximen, HT-2 Toxin und DAS zu Hemisuccinaten und Verrucaridin A zu einem Hemiglutarat umgesetzt. Diese Derivatisierungsprodukte und Ochratoxin A wurden mittels aktiver Estermethode an HRP gekoppelt (MÄRTLBAUER und TERPLAN, 1985; RENZ, 1989; ESGIN, 1987; KLÄFFER et al., 1988; MÄRTLBAUER et al., 1988; MÄRTLBAUER, 1988).

Kreuzreaktionen der verwendeten Antiseren

Bei der Anwendung enzymimmunologischer Nachweisverfahren muß für die Interpretation der Ergebnisse stets auch die Spezifität der verwendeten Antiseren, d.h. deren relative Kreuzreaktion mit strukturähnlichen Stoffen, berücksichtigt werden. Dazu werden die entsprechenden Konzentrationen dieser Substanzen, die die Bindung des enzymmarkierten Toxins um 50% reduzieren (50%-Dosis) graphisch ermittelt. Die relative Kreuzreaktion ist dann definiert als das Verhältnis der 50%-Dosis des zur Immunisierung verwendeten Toxins zu der 50%-Dosis des kreuzreagierenden Toxins; sie wird meist in Prozent angegeben.

Unter den angewandten Testbedingungen (siehe Abb. 10a-c) weisen die Antiseren die in Tab. 12 wiedergegebenen relativen Kreuzreaktionen auf. Dabei wurden nur Werte > 5% berücksichtigt.

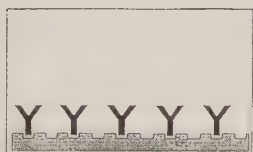
3.1.6 Durchführung der enzymimmunologischen Nachweisverfahren

Bei allen verwendeten Enzymimmunotests handelt es sich um direkte, kompetitive Verfahren, d.h. die Mikrotiterplatten werden mit Antiseren beschichtet. Toxin-Lösung und Toxin-Enzymkonjugate konkurrieren dann um die Antikörperbindungsstellen. Man unterscheidet dabei konsekutive und simultane Testanordnungen. Bei ersterer werden Toxinlösung und Toxin-Enzym-Konjugate nacheinander, bei letzterer gleichzeitig zugegeben. Einen Sonderfall der simultanen Testanordnung stellt die doppelte Antikörpertechnik dar. Hierbei werden die Mikrotiterplatten zuerst mit affinitätschromatographisch gereinigtem Anti-Kaninchen IgG-Serum beschichtet (MÄRTLBAUER, 1988) und danach gleichzeitig Toxinlösung, Toxin-

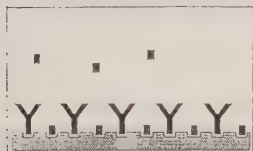
Tabelle 12: Die wichtigsten relativen Kreuzreaktionen der verwendeten Anti-Toxin-Seren (Literatur s. Seite 49)

Anti-Toxin-Serum gegen:	relative Kreuzreaktionen (in %) mit:	
Aflatoxin B ₁	keine praxisrelevanten Kreuzreaktionen	
Aflatoxin M ₁	Aflatoxin B ₁ (12,4%)	Aflatoxin M ₂ (9,5%)
DAS	3a Acetyl-DAS (597%)	T-2 Toxin (5,2%)
T-2 Toxin	AcetylT-2 Toxin (>100%)	HT-2 Toxin (40%)
Roridin A	Satratoxin H (74,1%)	Roridin J (54,1%)
	Verrucaridin A (36,3%)	Satratoxin G (17,2%)
Ochratoxin A	keine Kreuzreaktionen bestimmt	
Zearalenon	α -Zearalenol (41,6%)	α -Zearalanol (27,7%)
	β -Zearalenol (13,8%)	

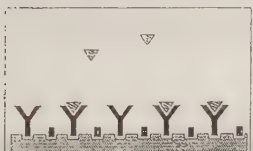
Enzym-Konjugat und Anti-Toxin-Serum zugegeben. In den Abb. 10a-c sind die unterschiedlichen Testanordnungen schematisch dargestellt und desweiteren die Arbeitsschritte bei der Durchführung der jeweiligen Enzymimmunotests erläutert. In den Abb. 11 sind typische Standardkurven dieser Tests dargestellt.



Beschichten mit 100 μ l Anti-AFM₁-Serum
(Verdünnung 1:6000 in Bicarbonatpuffer)
Inkubation 16 h bei Raumtemperatur (RT)
danach Antiserumlösung abkippen



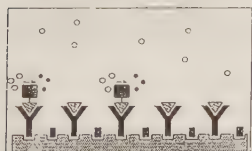
Blockierung freier Proteinbindungsstellen
der Mikrotiterplatte mit 200 μ l 3% FKS/PBS
Inkubation 30 min. bei RT
danach Platte 3x mit Waschlösung waschen



+ 100 μ l Toxin- bzw. Probenlösung
(in 10% Methanol/PBS vorliegend)
Inkubation 1 h bei RT
Toxinlösung absaugen

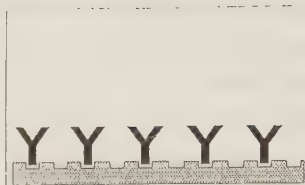


+ 100 μ l AFM₁-Enzym-Konjugat
(Verdünnung 1:40000 in 1% FKS/PBS)
Inkubation 1 h bei RT
danach Platte 3x mit Waschlösung waschen

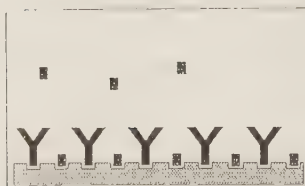


+ 100 μ l Substratlösung
Inkubation 10-20 min.
+ 100 μ l Schwefelsäure (1mol/l)
Extinktion bei 450 nm messen

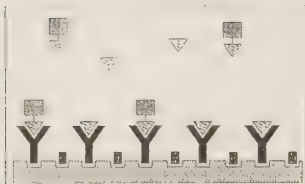
Abbildung 10a: Arbeitsschritte bei der Durchführung des
konsekutiven Enzymimmunitestes zum Nachweis
von Aflatoxin M₁ (AFM₁) (Angaben in μ l/Kavität)



Beschichten mit 100 μ l Antiserum
Anti-T-2-Serum, Anti-Zea-Serum bzw. Anti-DAS-Serum (Verdünnung jeweils 1:1000 in Bicarbonatpuffer)
Inkubation 16 h bei Raumtemperatur (RT)
danach Antiserumlösung abkippen



Blockierung freier Proteinbindungsstellen der Mikrotiterplatte mit 200 μ l 3% FKS/PBS
Inkubation 30 min. bei RT
danach Platte 3x mit Waschlösung waschen

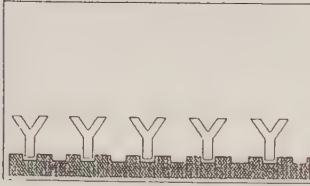


+ 50 μ l Toxin- bzw. Probenlösung (in 10% Methanol/PBS vorliegend)
+ 50 μ l HT-2-Enzym-Konjugat (1:20000), Zea-Enzym-Konjugat (1:100000) bzw. DAS-Enzym-Konjugat (1:50000) in 1% FKS/PBS
Inkubation 1 h bzw. 2 h bei RT
danach Platte 3x mit Waschlösung waschen

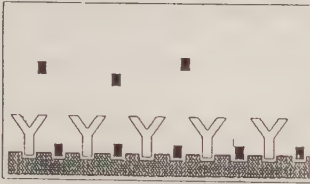


+ 100 μ l Substratlösung
Inkubation 10-20 min.
+ 100 μ l Schwefelsäure (1mol/l)
Extinktion bei 450 nm messen

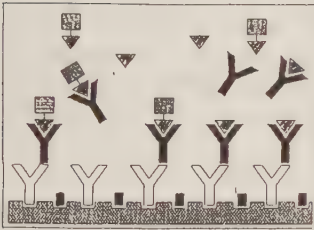
Abbildung 10b: Arbeitsschritte bei der Durchführung des simultanen Enzymimmunosyndes zum Nachweis von T-2 Toxin (T-2) Zearalenon (Zea) bzw. Diacetoxyscirpenol (DAS) (Angaben in μ l/Kavität)



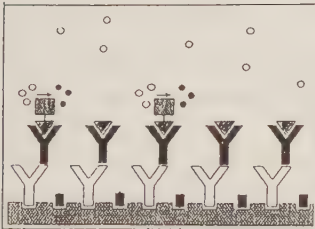
Beschichten mit 100 μ l Anti-Kaninchen-IgG-Serum (10 μ g/ml Bicarbonatpuffer)
Inkubation 16 h bei Raumtemperatur
danach Antiserumlösung abkippen



Blockierung freier Proteinbindungsstellen
der Mikrotiterplatte mit 200 μ l 3% FKS/PBS
(entfällt bei OA-ELISA)
Inkubation 30 min. bei RT
danach Platte 3x mit Waschlösung waschen



+ 33 μ l Toxin- bzw. Probenlösung
(in 10% Methanol/PBS vorliegend; bei
OA-ELISA in 0,13 mol/l NaHCO_3)
+ 33 μ l AFB_1 -Enzym-Konjugat (1:66666) bzw.
Verrucaridin A-Enzym-Konjugat (1:33333) in
1% FKS/PBS; OA-Enzym-Konjugat (1:13333) in
1% Tween 20/0,13 mol/l NaHCO_3
+ 33 μ l Anti- AFB_1 -Antiserum (1:33333) bzw.
Anti-RoA-Antiserum (1:13.333) in PBS;
Anti-OA-Antiserum (1:30000) in NaHCO_3
Inkubation 2 h bei RT bzw. bei OA-Elisa
16h bei 4 $^{\circ}\text{C}$
danach Platte 3x mit Waschlösung waschen



+ 100 μ l Substratlösung
Inkubation 10-20 min.
+ 100 μ l Schwefelsäure (1mol/l)
Extinktion bei 450 nm messen

Abbildung 10c: Arbeitsschritte bei der Durchführung des doppelten
Antikörper-ELISA zum Nachweis von Aflatoxin B_1
(AFB_1), Roridin A (RoA) und Ochratoxin A (OA)
(Angaben in μ l/Kavität)

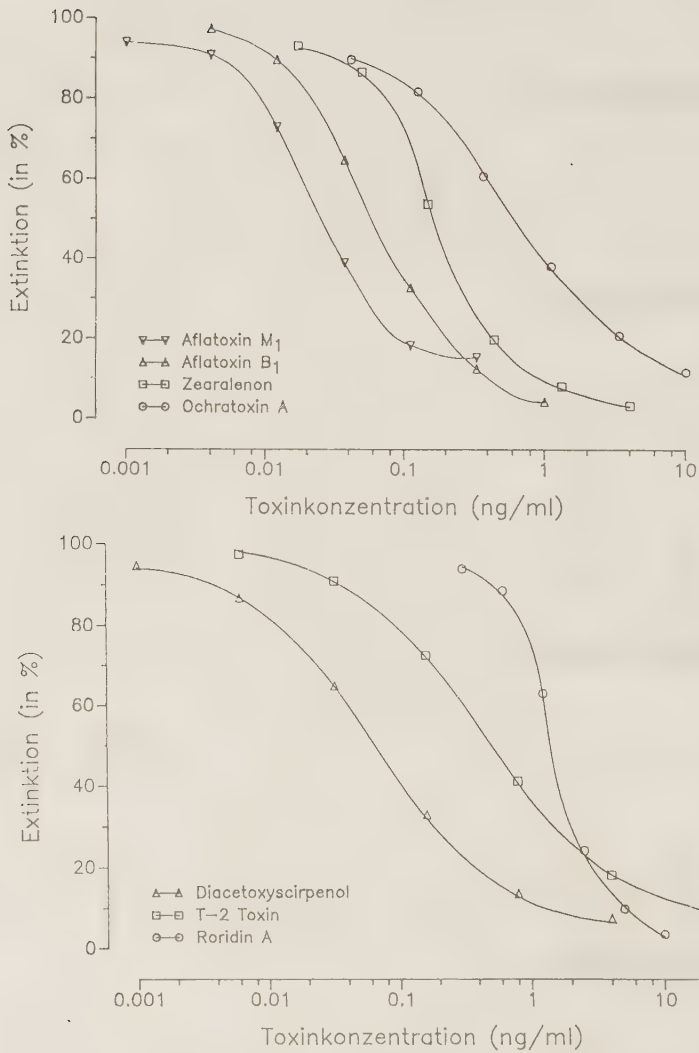


Abbildung 11: Vergleich der Standardkurven der enzymimmunologischen Verfahren zum Nachweis von Mykotoxinen

3.2 Entwicklung von Extraktionsmethoden zum Nachweis von Mykotoxinen in Zerealien mittels ELISA

3.2.1 Vorversuche

Zur Entwicklung einer Extraktionmethode für den Nachweis von Mykotoxinen in Zerealien mittels ELISA wurden drei Verfahren getestet mit dem Ziel eine möglichst vollständige Extraktion der Toxine aus der Probenmatrix zu erreichen. Dabei sollten die Extrakte keine Störung des enzymimmunologischen Nachweises bewirken und die Methode sollte auf verschiedene Probenmatrizes anwendbar sein.

Zur Klärung der Frage, ob Extrakte eine unspezifische Störung des Testsystems im Sinne von falsch positiven Ergebnissen bewirken, bietet sich bei immunologischen Nachweisverfahren der Neutralisationstest an. Hierbei wird das in einem Extrakt vorliegende freie Toxin durch Zugabe von spezifischen Antikörper gebunden. Treten bei der Untersuchung mittels ELISA eines solch vorbehandelten Extraktes noch positive Ergebnisse auf, so sind diese Werte als falsch positiv zu betrachten, der Extrakt bewirkt also eine Störung des Testsystems. Ein solcher Neutralisationstest stand allerdings nur für Zearalenon zur Verfügung (RENZ, 1989).

3.2.1.1 Material und Methode

2 g von natürlich mit Zearalenon kontaminierten Zerealien wurden mit den folgenden Methoden jeweils 20 min auf einem Magnetrührer extrahiert.

Methode A:

Probe mit 15 ml Dichlormethan extrahieren und anschließend filtrieren; 4 ml des Filtrates eindampfen; Rückstand in 2,0 ml Methanol, 2,0 ml PBS und 1,5 ml Heptan aufnehmen, zentrifugieren; wässrige Phase mit PBS auf einen Methanolgehalt von 10% einstellen

Methode B:

Probe mit 10 ml Methanol/A.dest. (70:30) extrahieren und anschließend filtrieren; Extrakt mit PBS auf einen Methanolgehalt von 10% einstellen.

Methode C:

Probe mit 10 ml Methanol/A.dest. extrahieren und anschließend filtrieren; Extrakt mit Dichlormethan ausschütteln und wie bei Methode A beschrieben weiterbehandeln (genauerer siehe Kapitel 3.2.2.1.)

Die erhaltenen Extrakte (alle in PBS mit 10% Methanolzusatz) wurden jeweils vor und nach dem Neutralisationstest in den ELISA eingesetzt.

Durchführung des Neutralisationstestes:

Die jeweiligen Endextrakte wurden mit Anti-Zearalenon-Antiserum inkubiert (RENN, 1989). Zur Entfernung des an die spezifischen Antikörper gebundenen Toxins wurden die Extrakte über einen Centricon Mikrokonzentrador (Ausschlußgrenze bei einem Molekulargewicht von 10000) filtriert, und nachfolgend ebenfalls in den ELISA eingesetzt. Zum Vergleich wurden auch unbehandelte bzw. mit Präimmunsereum inkubierte Extrakte über den Mikrokonzentrador filtriert.

3.2.1.2 Ergebnisse

Die mit der Methode A gewonnenen Extrakte zeigten nach Durchführung des Neutralisationstestes keinen unspezifischen Einfluß auf das Nachweissystem; es wurde jedoch nur etwa die Hälfte des Zearalenons von der Probenmatrix gelöst. Mit der Methode B konnte zwar das Zearalenon vollständig extrahiert werden, die Extrakte riefen jedoch nach dem Neutralisationstest noch eine Störung des Testsystems hervor, die bei Hafer und Mischfuttermittel besonders ausgeprägt war. Diese Schwierigkeiten traten bei der Methode C, die eine Kombination der Methoden A und B darstellt, nicht mehr auf.

3.2.2 Nachweis von Aflatoxin B₁, Zearalenon, T-2 Toxin, Diacetyxyscirpenol und Roridin A in Zerealien mittels ELISA

3.2.2.1 Material und Methode

Zur Extraktion wurden 2 g Probe mit 10 ml Methanol/A.dest. (70:30) 10 min auf dem Magnetrührer extrahiert und dann filtriert. 2 ml des filtrierten Extraktes wurden in einem Reagenzglasröhrchen mit 2 ml A.dest. versetzt und kurz mit einem Vortex-Schüttler vermischt. Dieses Methanol/A.dest.-Gemisch wurde anschließend mit 3 ml Dichlormethan ausgeschüttelt (30 s auf Vortex-Schüttler) und anschließend zur Phasentrennung kühlzentrifugiert (15 min, 3500 g, 4 °C). Die untere Dichlormethanphase wurde mit einer Pasteurpipette entnommen, in ein weiteres Reagenzglasröhrchen überführt und im Wasserbad unter Vakuum abgedampft. Der Rückstand wurde in 1 ml Methanol, 1 ml PBS und 1,5 ml Heptan aufgenommen und wieder zentrifugiert (10 min, 2000 g, 4 °C). Die untere, wäßrige Phase wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette entnommen und nach Einstellen des Methanolgehaltes auf 10 % im ELISA eingesetzt (je 2 voneinander unabhängige Verdünnungen im Vierfachansatz).

Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten wurden Gerste, Weizen, Hafer und Mischfuttermittel mit den entsprechenden Toxinzusätzen in methanolischer Lösung versetzt. Das Methanol wurde anschließend bei 50 °C abgedampft. Diese künstlich kontaminierten Proben wurden jeweils mindestens fünffach extrahiert und der Toxingehalt bestimmt.

Zur Bestimmung der Wiederholbarkeit der Methode wurden außerdem natürlich kontaminierte Proben mit verschiedenen Toxingehalten ebenfalls mindestens fünf- bis sechsfach extrahiert und analysiert.

3.2.2.2 Ergebnisse

Wie sich in Vorversuchen zeigte, war es nötig - abhängig von der Probenmatrix, jedoch unabhängig vom ELISA-Testsystem - die in PBS

mit 10 % Methanolzusatz vorliegenden Extrakte zum Teil noch höher vor dem Einsatz im ELISA zu verdünnen:

Substrat	Mindestverdünnung für den Einsatz im ELISA	= g Probe/ml
Gerste	-	0,04
Weizen	1 : 2	0,02
Hafer	1 : 3	0,013
Mischfuttermittel	1 : 3	0,013

Die mit dieser Methode erhaltenen Extrakte verursachten in unterschiedlichen ELISA-Testsystemen (simultanes Prinzip bei T-2 Toxin-, DAS- und Zearalenon-ELISA, doppeltes Antikörperprinzip beim Roridin A- und Aflatoxin B₁-ELISA) nur mehr geringe Störungen des Testsystems. Die Variationskoeffizienten der eingesetzten Verdünnungen lagen in der Regel unter 3%. Bei der Auswertung im ELISA wurden deshalb die Verdünnungen, deren Variationskoeffizienten im Vierfachansatz über 10% lagen, nicht berücksichtigt.

Die alkohollöslichen Proteine des Weizens, die sogenannten Gliadine haben eine optimale Löslichkeit in 70%igen alkoholischen Lösungen. Beim Ausschütteln von Weizenrohextrakten mit Dichlormethan kommt es infolge Denaturierung der gelösten Gliadine zu einer gallertartigen Emulsionsbildung, die es erforderlich macht die obere klare wäßrige Phase abzusaugen und mit kurzem Schütteln auf dem Vortex das Dichlormethan aus der Emulsion zu lösen.

Die Ergebnisse zur Bestimmung von Wiederfindungsraten und Wiederholbarkeit sind in Tab. 13a-15a sowie 16 und 17 bzw. 13b-15b dargestellt.

Tabelle 13a: Wiederfindungsraten von Aflatoxin B₁ in künstlich kontaminierten Gerste-, Weizen-, Hafer- und Mischfuttermittelproben

GERSTE					WEIZEN			
Toxinzusatz (ng/g)	0,90	1,8	3,6	6,0	1	2	4	6
n	5	5	6	6	5	6	7	6
x	0,66	1,23	2,48	3,76	0,58	1,04	1,91	3,20
s	0,12	0,06	0,16	0,45	0,10	0,10	0,12	0,29
VK	18,2	4,9	6,5	12,0	17,2	9,6	6,3	9,1
W	73,3	68,3	68,9	62,7	58,0	52,0	47,8	53,3

HAFER					MISCHFUTTERMITTEL			
Toxinzusatz (ng/g)	2	4	6	8	2	4	6	8
n	6	6	6	6	9	9	7	7
x	0,76	2,38	3,66	4,76	1,04	1,98	2,93	4,24
s	0,20	0,50	0,44	0,23	0,11	0,15	0,33	0,35
VK	26,8	20,9	12,0	4,8	10,6	8,1	11,3	8,3
W	38,0	59,5	61,0	59,5	52,0	49,5	48,8	53,0

Zeichenerklärung siehe Tab. 17

Tabelle 13b: Mittelwerte (ng/g), Standardabweichungen und Variationskoeffizienten von natürlich mit Aflatoxin B₁ kontaminierten Mischfuttermittelproben, die in Mehrfachansätzen untersucht wurden

Probe	1	2	3	4	5	6
n	6	6	6	6	6	6
x	4,67	4,87	5,25	5,85	6,91	10,28
s	0,55	0,34	0,49	0,33	0,64	0,43
VK	11,8	7,0	9,3	5,6	9,3	4,2

Tabelle 14a: Wiederfindungsraten von Zearalenon in künstlich kontaminierten Gerste-, Weizen-, Hafer- und Mischfuttermittelproben

GERSTE					WEIZEN			
Toxinzusatz (ng/g)	2	5	10	20	2	5	10	20
n	5	5	5	6	5	5	5	6
x	2,28	4,23	9,11	17,39	1,47	3,74	7,12	15,58
s	0,49	0,43	0,70	2,06	0,18	0,61	0,82	1,59
VK	21,5	10,2	7,7	11,8	12,2	16,3	11,5	10,2
W	114,0	84,6	91,1	87,0	73,5	74,8	71,2	77,9

HAFER					MISCHFUTTERMITTEL			
Toxinzusatz (ng/g)	2	5	10	20	2	5	10	20
n	5	7	7	6	7	7	7	6
x	1,53	4,28	7,10	14,31	1,60	4,00	7,11	14,72
s	0,19	0,61	0,68	1,58	0,29	0,31	0,66	1,79
VK	12,3	14,2	9,7	11,0	18,1	7,8	9,3	12,2
W	76,5	85,6	71,0	71,6	80,0	80,0	71,1	73,6

Zeichenerklärung siehe Tab. 17

Tabelle 14b: Mittelwerte (ng/g), Standardabweichungen und Variationskoeffizienten von natürlich mit Zearalenon kontaminierten Winterweizenproben, die in Mehrfachansätzen untersucht wurden

Probe	1	2	3	4	5
n	5	5	6	6	6
x	4,73	12,69	17,84	39,92	43,59
s	0,76	1,08	1,44	4,37	4,52
VK	16,1	8,5	8,1	10,9	10,4

Tabelle 15a: Wiederfindungsraten von T-2 Toxin in künstlich kontaminierten Gerste-, Weizen-, Hafer- und Mischfuttermittelproben

GERSTE					WEIZEN			
Toxinzusatz (ng/g)	2,4	6,1	12,4	18,6	2	5	11,3	22,6
n	5	6	6	6	5	6	5	5
x	2,42	6,07	11,83	17,94	1,90	4,92	10,01	22,51
s	0,20	0,65	0,73	0,99	0,28	0,27	1,09	2,73
VK	8,3	10,7	6,2	5,5	14,6	5,5	10,9	12,1
W	100,5	99,6	95,4	96,5	94,9	98,3	88,7	99,8

HAFER					MISCHFUTTERMITTEL			
Toxinzusatz (ng/g)	2,5	7,9	15,9	31,8	2	5	10	20
n	5	5	8	6	5	5	7	6
x	2,33	7,27	13,35	28,27	1,88	4,38	8,84	18,83
s	0,22	0,24	1,70	1,97	0,36	0,50	0,90	1,09
VK	9,4	3,3	12,7	7,0	19,0	11,3	9,6	5,8
W	93,2	92,0	84,0	88,9	94,0	87,6	88,4	94,2

Zeichenerklärung siehe Tab. 17

Tabelle 15b: Mittelwerte (ng/g), Standardabweichungen und Variationskoeffizienten von natürlich mit T-2 Toxin kontaminierten Haferproben, die in Mehrfachansätzen untersucht wurden

Probe	1	2	4	5	6	7	9	10
n	4	5	5	5	5	5	5	6
x	6,80	14,34	18,57	19,82	32,40	52,13	86,28	114,20
s	0,57	1,48	2,42	2,95	3,53	4,81	5,84	8,13
VK	8,4	10,3	13,0	14,9	10,9	9,2	6,8	10,3

Tabelle 16: Wiederfindungsraten von DAS in künstlich kontaminierten Gerste-, Weizen-, Hafer- und Mischfuttermittelproben

GERSTE					WEIZEN			
Toxinzusatz (ng/g)	1	5	7,5	10	2	5	7,5	10
n	5	6	5	7	5	5	8	5
x	0,83	4,44	6,08	9,63	1,92	3,90	5,56	8,36
s	0,18	0,77	0,08	0,88	0,15	0,56	0,60	0,53
VK	21,6	17,3	1,5	8,0	8,0	14,5	10,9	6,4
W	83,4	88,8	81,1	96,3	95,9	78,0	74,2	83,6
HAFER					MISCHFUTTERMITTEL			
Toxinzusatz (ng/g)	1,1	5	7,5	10	3	10	12,5	25
n	5	5	6	6	5	6	7	5
x	1,12	4,87	6,89	9,16	2,74	9,0	11,0	22,7
s	0,07	0,08	0,24	0,57	0,35	1,15	1,40	3,52
VK	6,3	1,6	3,5	6,2	12,8	12,8	12,7	15,5
W	101,8	97,4	91,9	91,6	91,3	90,0	87,9	90,6

Zeichenerklärung siehe Tab. 17

Tabelle 17: Wiederfindungsraten von Roridin A in künstlich kontaminierten Gerste-, Weizen-, Hafer- und Mischfuttermittelproben

GERSTE					WEIZEN			
Toxinzusatz (ng/g)	54	72	90	135	54	72	90	135
n	5	5	5	5	6	5	5	5
x	44,6	56,6	78,0	140,6	50,6	63,5	81,6	114,6
s	6,1	7,3	8,3	27,5	3,5	4,5	2,4	11,1
VK	13,7	13,0	10,7	19,5	6,9	7,2	2,9	9,7
W	82,6	78,6	86,7	104,2	93,6	88,2	90,7	84,9
HAFER					MISCHFUTTERMITTEL			
Toxinzusatz (ng/g)	45	60	75	112,5	37,5	50	62,5	94
n	5	6	7	7	7	7	6	10
x	38,8	58,2	71,5	105,3	32,9	48,0	60,1	79,9
s	2,8	2,7	7,4	10,7	5,1	3,8	5,0	9,8
VK	7,3	4,6	10,3	10,2	15,6	8,0	8,3	12,2
W	85,7	97,0	95,4	93,6	87,7	96,0	96,2	85,0

Zeichenerklärung: n = Probenanzahl

x = arithmetischer Mittelwert

s = Standardabweichung

VK = Variationskoeffizient (%)

W = Wiederfindung (%)

Die durchschnittlichen Wiederfindungsraten für T-2 Toxin, DAS, Roridin A, Zearalenon und Aflatoxin B₁ in Gerste, Weizen, Hafer und Mischfuttermittel sind in Tab. 18 wiedergegeben.

Tabelle 18: Durchschnittliche Wiederfindungsraten (%) von T-2 Toxin, DAS, Roridin A, Zearalenon und Aflatoxin B₁ in verschiedenen künstlich kontaminierten Probenmatrizes

Toxin	T-2 Toxin	DAS	Roridin A	Zearalenon	Aflatoxin B ₁
Gerste	98,0	87,4	88,0	94,2	68,3
Weizen	95,4	82,9	89,4	74,4	52,8
Hafer	89,5	95,7	92,9	76,2	54,5
Mischfutter- mittel	91,1	90,0	91,2	76,2	50,8
durchschnittl. Wiederfindung	93,5	89,0	90,4	80,3	56,6

Sie betrugen bei den Trichothecenen 89,0 - 93,5%, für Zearalenon 80,3% und für Aflatoxin B₁ 56,6%. Die geringeren Wiederfindungsraten für Aflatoxin B₁ dürften vor allem auf Verluste beim Ausschütteln des Rohextraktes mit Dichlormethan zurückzuführen sein.

Zur Bestimmung der Wiederholbarkeit der Verfahren wurden natürlich kontaminierte Proben mehrfach extrahiert (Tab. 13b - 15b). Die durchschnittlichen Variationskoeffizienten lagen bei T-2 Toxin in künstlich kontaminierten Proben bei 9,5%, in natürlich kontaminiertem Hafer bei 10,6%, für Zearalenon bei 12,3% bzw. in natürlich kontaminiertem Winterweizen bei 10,8%, für Aflatoxin B₁ bei 11,7% bzw. in natürlich belasteten Mischfuttermitteln bei 7,9%. Für Roridin A und DAS standen keine bzw. nicht in genügendem Umfang natürlich kontaminierte Proben zur Verfügung.

3.2.3 Nachweis von Ochratoxin A in Zerealien mittels ELISA

Die im Kapitel 3.2.2 beschriebene Extraktionsmethode ist für Ochratoxin A nicht anwendbar, da zum einen dieses Mykotoxin nur bei entsprechendem Ansäuern des Rohextraktes mit Dichlormethan ausgeschüttelt werden kann, was jedoch zu z.T. nicht mehr brechbaren Emulsionen führt. Zum anderen hat der Ochratoxin ELISA eine fünf- bis zehnfach geringere Empfindlichkeit als die enzymimmunoologischen Nachweisverfahren für T-2 Toxin, Zearalenon, DAS und Aflatoxin B₁, so daß mit der beschriebenen Extraktionsmethode Ochratoxin A erst ab 10 ng/g in Getreide nachzuweisen wäre. Die im Rahmen dieser Untersuchungen entwickelte Methode basiert auf der pH-abhängigen Löslichkeit des Ochratoxin A in wäßrigen bzw. in organischen Lösungsmitteln.

3.2.3.1 Material und Methode

2 g einer fein gemahlten Probe wurden in ein 50 ml Zentrifugenglas abgewogen, mit 5 ml Salzsäure (1 mol/l) versetzt und 5 min auf einem Magnetprüher vermischt. Nach Zugabe von 10 ml Dichlormethan wurde die Probe weitere 15 min extrahiert und anschließend zum Brechen der entstandenen Emulsion 15 min bei 3500 g und 4 °C kühlzentrifugiert. Nach Absaugen der oberen wäßrigen Phase und vorsichtigem Durchstechen des zwischen den Phasen liegenden Probekuchens wurde die Dichlormethanphase quantitativ in ein weiteres 50 ml Zentrifugenglas überführt, mit 10 ml einer NaHCO₃-Lösung (0,13 mol/l; pH 8,1) versetzt, 15 min auf einem Magnetprüher vermischt und anschließend wiederum 15 min bei 3500 g kühlzentrifugiert. Aliquote der oberen wäßrigen Phase wurden anschließend zur Untersuchung im ELISA verwendet.

Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten wurden Gerste und Weizen mit den entsprechenden Toxinzusätzen in methanolischer Lösung versetzt. Das Methanol wurde anschließend bei 50 °C abgedampft. Diese künstlich kontaminierten Proben wurden jeweils mindestens fünffach extrahiert und der Toxingehalt bestimmt.

Zur Bestimmung der Wiederholbarkeit der Methode wurden außerdem natürlich kontaminierte Gersteproben mit verschiedenen Toxingehalten ebenfalls extrahiert und analysiert.

3.2.3.2 Ergebnisse

Bei der Untersuchung von Hafer und Mischfuttermitteln zeigte sich, daß die im ELISA eingesetzten Extrakte das Testsystem störten, was zu falsch positiven Ergebnissen führte. Diese Schwierigkeiten konnten weder durch das Einsetzen von höheren Extraktverdünnungen in den ELISA noch durch ein nochmaliges Ausschütteln des Extraktes mit Dichlormethan behoben werden. Daher muß bei der Untersuchung solcher Substrate berücksichtigt werden, daß die Auswertung im ELISA entweder falsch positive Ergebnisse oder höhere Ochratoxin A Gehalte ergibt als tatsächlich vorhanden sind. Aus diesen Gründen wurde auf die Bestimmung von Wiederfindungsraten in Hafer und Mischfuttermitteln verzichtet. Die Untersuchung solcher Substrate mittels ELISA erlaubt aber bei Berücksichtigung der unspezifischen Störung des Testsystems und bei entsprechend hoher Kontamination der Proben eine semiquantative Aussage über deren Ochratoxin A Gehalt. Dies trifft insbesondere für die Untersuchung von Hafer zu. Gerste- und Weizenextrakte wiesen keine Störungen des Testsystems auf.

Die Wiederfindungsraten von Ochratoxin A in künstlich kontaminierten Gerste- und Weizenproben sind in Tab. 19 wiedergegeben. Sie betrugen durchschnittlich in Weizen 74,4%, in der Gerste 92,8%. Die Zugabe der Salzsäure zum Weizen verursacht eine ausgeprägtere Proteinquellung als bei der Gerste, was die geringeren Wiederfindungsraten in dieser Getreideart erklären könnte.

Die Ergebnisse der Mehrfachuntersuchung von natürlich kontaminierten Gersteproben sind der Tab. 19a zu entnehmen.

Tabelle 19: Wiederfindungsraten von Ochratoxin A in künstlich kontaminierten Gerste- und Weizenproben

	WEIZEN				GERSTE		
Toxinzusatz (ng/g)	1,0	2,5	5,0	10,0	2,5	5	10
n	5	5	5	8	9	10	9
x	0,78	1,92	3,81	6,65	2,43	4,22	9,69
s	0,10	0,34	0,29	1,20	0,33	0,51	1,15
VK	12,8	17,7	7,6	18,0	13,6	12,1	11,9
W	78,0	76,8	76,2	66,5	97,2	84,4	96,9

Zeichenerklärung siehe Tabelle 17

Tabelle 19a: Mittelwerte (ng/g), Standardabweichungen und Variationskoeffizienten von natürlich mit Ochratoxin A kontaminierten Gersteproben, die in Mehrfachansätzen untersucht wurden

Probe	1	2	3	4	5
n	6	4	7	7	6
x	1,95	6,67	17,53	22,26	56,72
s	0,43	0,71	2,37	2,50	6,38
VK	22,1	10,6	13,5	11,2	11,2

3.3 Entwicklung einer Extraktionsmethode zum Nachweis von Ochratoxin A und Citrinin in Zerealien mittels HPLC

3.3.1 Nachweis in künstlich kontaminierten Zerealien

Zur Verifizierung der enzymimmunologischen Ergebnisse wurde eine HPLC Methode entwickelt.

P. viridicatum - der in unseren Breiten vorherrschende Ochratoxin A Bildner - produziert u.a. auch noch Citrinin, dem ebenfalls nephrotoxische Wirkung zugesprochen wird, so daß es nahe lag auch dieses Mykotoxin in die Untersuchungen miteinzubeziehen.

Die Extraktionsmethode für den enzymimmunologischen Nachweis von Ochratoxin erfordert zum Brechen der Emulsion einen Zentrifugationsschritt, der für die bei einer chemisch-physikalischen Nachweismethode benötigten Lösungsmittelmengen nicht praktikabel erscheint. Es mußte daher auf eine in der gängigen Literatur beschriebene Methode zurückgegriffen werden. Allerdings wurde bei dem von uns verwendeten Eluenten der Citrinin-Peak durch Probeninterferenzen überlagert. Diese Schwierigkeiten wurden mittels einer säulenchromatographischen Reinigung des Extraktes behoben.

Bei dem für den Nachweis von Ochratoxin A in Schweineseren beschriebenen HPLC Eluenten (MÄRTLBAUER, 1988) weisen Ochratoxin A und Citrinin identische Retentionszeiten auf.

3.3.1.1 Material und Methode

Die Gewinnung des Rohextraktes erfolgte in Anlehnung an MARTI et al. (1978). 12 g einer fein gemahlten Probe wurden in einen 250 ml Erlenmeyerkolben eingewogen, mit den entsprechenden Toxinzusätzen in methanolischer Lösung versetzt und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur zum Abdampfen des Lösungsmittels stehen gelassen. Nach Zugabe von 90 ml Acetonitril und 10 ml einer 4% (g/v) Kaliumchloridlösung, die 4% (v/v) konz. H_2SO_4 enthielt, 20 min auf einem Magnetrührer extrahiert und anschließend filtriert. 50 ml des Filtrates wurden in einem Scheidetrichter mit 25 ml

Hexan entfettet. Nach Phasentrennung wurde die untere wäßrige Phase nochmals mit 12,5 ml Hexan ausgeschüttelt. Nach Verwerfen der Hexan-Phase wurden 12,5 ml A.dest. und 25 ml Chloroform zugegeben und ca. 1 min vorsichtig geschüttelt. Nach Absetzen der wäßrigen Phase wurde die untere CHCl_3 - Acetonitril Phase über wasserfreies Natriumsulfat und eine Nutsche gegeben und anschließend mit einem Rotationsverdampfer eingedampft. Der Rückstand wurde in 3 ml CHCl_3 -Hexan (1:3 v/v) aufgenommen.

Säulenchromatographische Reinigung:

Es wurde eine Silicia Sep-pak Kartusche verwendet, die mit 3 ml einer 10% (g/v) methanolischen Oxalsäurelösung beschichtet und anschließend mit 4 ml CHCl_3 -Hexan (1:3 v/v) äquilibriert wurde. Nach Zugabe der Probe wird das Citrinin mit 7 ml CHCl_3 -Hexan (1:3 v/v) eluiert. Die Elution des Ochratoxin A erfolgte bei Hafer und Mischfuttermittelp Proben mit 10 ml CHCl_3 -Hexan (8:2 v/v), ansonsten mit 6 ml CHCl_3 . Die Eluate wurden jeweils in einem 10 ml Spitzkolben aufgefangen, vollständig eingedampft und in 250 μl Methanol (für Chromatographie) aufgenommen. Nach Filtration über Filtereinheiten (0,22 μm Porengröße) wurden die Extrakte in Aliquoten von 10 μl mittels HPLC unter folgenden Bedingungen analysiert:

Säule: Spherisorb 5 μm ODS

Eluent: Methanol/ 0,58 m Phosphorsäure/ Ethylacetat 65/32/3

Fluß: 0,7 ml/min

Detektion: Fluoreszenzemission bei 500 nm (Exzitation bei 335 nm)

Zur Erstellung der Eichgeraden wurden Ochratoxin A und Citrinin Standards im Bereich von 0,25 - 20 ng, bzw. 0,625 - 20 ng gemessen und die jeweilige Regressionsgerade berechnet. Die Toxin-gehalte der Proben wurden anhand der Geradengleichung ermittelt.

3.3.1.2 Ergebnisse

Wie anhand der HPLC-Chromatogramme (Abb. 12a-d) zu ersehen ist, führt die entwickelte einfache säulenchromatographische Extrakt-aufreinigung vor allem bei Weizen und Gerste zu einer vollständigen Abtrennung von im Extrakt verbliebenen Bestandteilen der Probenmatrix. Bei Kraftfutter sind aufgrund der komplexeren Probenmatrix allerdings einige Abstriche beim Nachweis von Citrinin in Kauf zu nehmen.

Der hochdruckflüssigkeitschromatographische Nachweis von Ochra-toxin A und insbesondere von Citrinin erfordert eine starke An-säuerung (ca. pH 2,3) des Laufmittels, um die Ionisation der beiden Mykotoxine und daraus resultierende Effekte wie Tailing oder Doppelpeaks zu vermeiden. Der Ethylacetatzusatz zum Lauf-mittel verhindert bei der von uns verwendeten Säule, daß Ochra-toxin A und Citrinin ähnliche oder identische Retentionszeiten aufweisen. Die durchschnittlichen Retentionszeiten für Citrinin und Ochratoxin A lagen bei 7,8 bzw. 12,9 min. Zearalenon, das unter den gewählten HPLC Bedingungen bei 13,1 min eluiert wird, könnte den Ochratoxin A Nachweis erschweren. Allerdings würden bei der verwendeten Detektoreinstellung nur Konzentrationen über 200 µg/kg Probe stören. Andere Ochratoxine, insbesondere Ochra-toxin B, C und 4-Hydroxyochratoxin A standen nicht zur Verfügung. Es darf allerdings angenommen werden, daß diese Toxine unter den gewählten HPLC-Bedingungen vom Ochratoxin A Peak deutlich abge-trennt werden.

Bei Anwendung oben beschriebener Methode lagen die durchschnitt-lichen Wiederfindungsraten für Ochratoxin A in Wintergerste bei 96,4%, für Citrinin bei 62,2%; die durchschnittlichen Variations-koeffizienten betrugen 5,9% bzw. 7,3% (Tab. 20). Die Wiederfin-dungsraten bei Weizen, Hafer und Kraftfutter lagen bei orien-tierenden Versuchen in einem ähnlichem Bereich. Die Nachweis-grenze liegt für Ochratoxin bei 1,2 µg/kg, für Citrinin aufgrund der schlechteren Wiederfindung bei 4,5 µg/kg. Bei Verwendung höherer Injektionsvolumina ließen sich wahrscheinlich auch noch geringere Toxingehalte nachweisen.

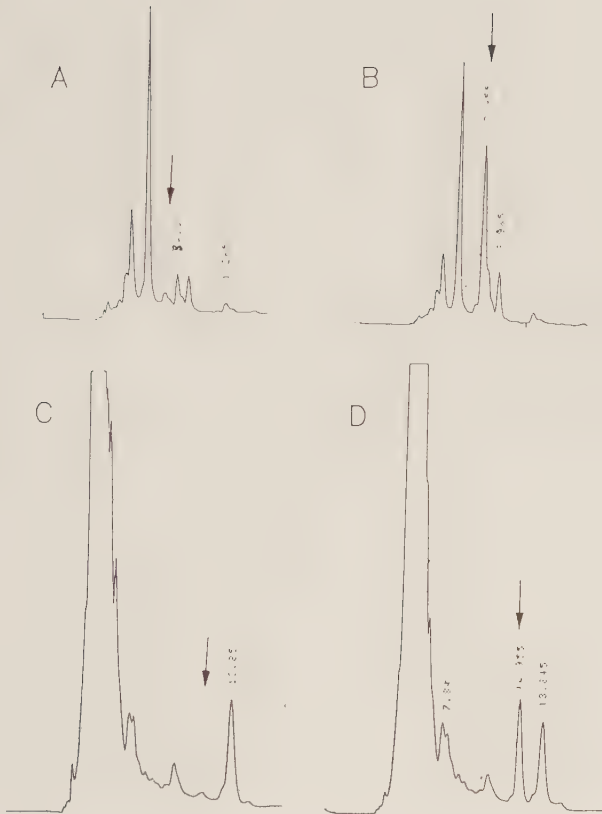


Abbildung 12a: HPLC-Chromatogramme zur Analyse von Citrinin und Ochratoxin A (Signalabschwächung 2^1): Wintergerste ohne (A) und mit Zusatz von 8 ng/g Citrinin (B) bzw. ohne (C) und mit Zusatz von 4 ng/g Ochratoxin A (D)

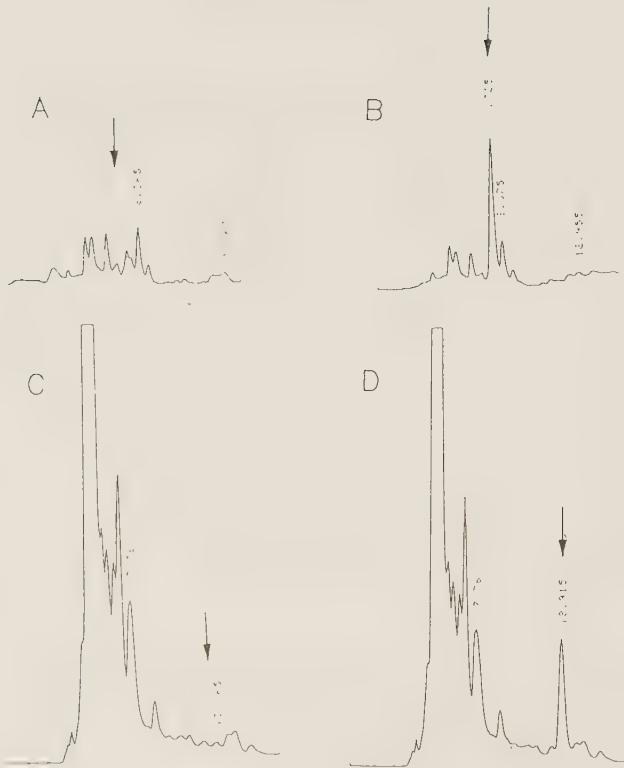


Abbildung 12b: HPLC-Chromatogramme zur Analyse von Citrinin und Ochratoxin A (Signalabschwächung 2^1): Winterweizen ohne (A) und mit Zusatz von 6 ng/g Citrinin (B) bzw. ohne (C) und mit Zusatz von 4,5 ng/g Ochratoxin A (D)

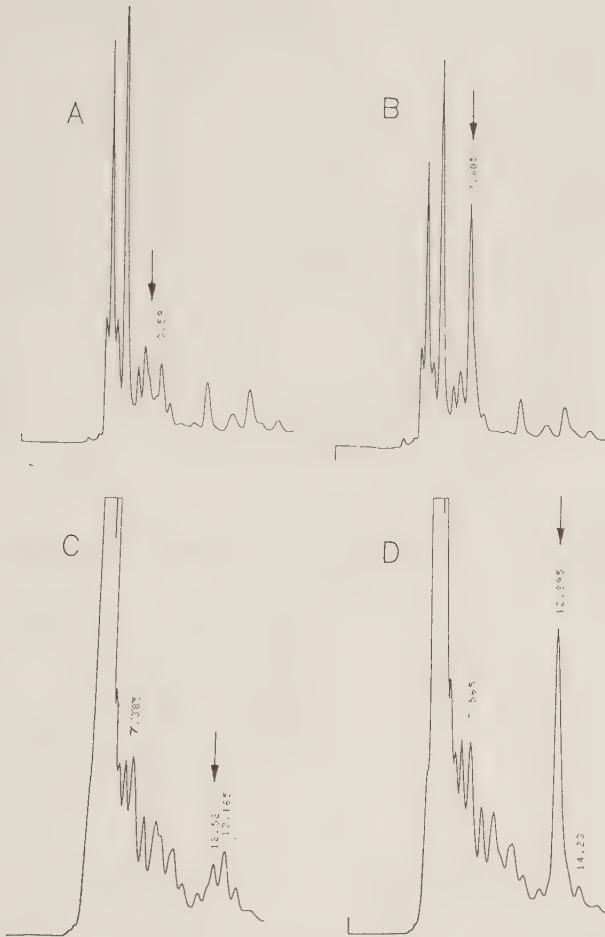


Abbildung 12c: HPLC-Chromatogramme zur Analyse von Citrinin und Ochratoxin A:

Hafer ohne (A) und mit Zusatz von
20 ng/g Citrinin (B) (Signalabschwächung 2¹)
bzw. ohne (C) und mit Zusatz von
60 ng/g Ochratoxin A (D) (Signalabschwächung 2³)

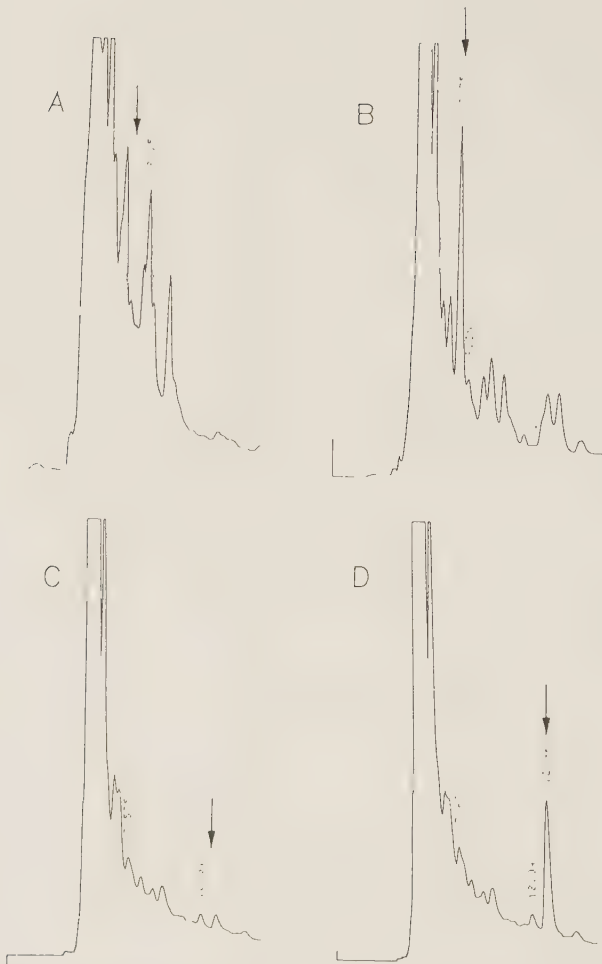


Abbildung 12d: HPLC-Chromatogramme zur Analyse von Citrinin und Ochratoxin A (Signalabschwächung 2^3): Kraftfutter ohne (A) und mit Zusatz von 50 ng/g Citrinin (B) bzw. ohne (C) und mit Zusatz von 20 ng/g Ochratoxin A (D)

Tabelle 20: Wiederfindungsraten von Ochratoxin A und Citrinin mittels HPLC in künstlich kontaminierter Wintergerste

	Toxinzugabe (µg/kg)	n	$\bar{x}_{\min.}$	$\bar{x}_{\max.}$	s	VK	W(%)
Ochratoxin A	4	5	3,58	4,21	0,26	6,7	96,5
	25	5	22,08	24,71	1,12	4,7	94,4
	60	5	54,50	63,17	3,75	6,4	98,3
	durchschnittliche Wiederfindungsrate: 96,4						
Citrinin	8	5	4,67	5,87	0,49	9,5	64,6
	40	5	20,42	26,30	2,25	9,7	57,9
	65	5	40,12	43,08	1,17	2,8	64,1
	durchschnittliche Wiederfindungsrate: 62,2						

Zeichenerklärung siehe Tab. 17

3.3.2 Nachweis in natürlich kontaminierten Zerealien

3.3.2.1 Material und Methode

Es wurden 22 natürlich kontaminierte Proben auf ihren Ochratoxin A- und Citrinin-Gehalt mit der im Kapitel 3.3.1.1. beschriebenen Methode untersucht.

3.3.2.2 Ergebnisse

Wie aus Abb. 13 zu ersehen ist, enthielten von 21 Ochratoxin A positiven Proben 18 Proben auch Citrinin. Die Ochratoxin A Werte lagen in einem Bereich von 1,5 - 1416 µg/kg, die Citrinin Werte in einem Bereich von 4,7 - 3445,8 µg/kg. Bei diesen Werten ist die Wiederfindungsrate nicht berücksichtigt, da deren Ermittlung nur bei der Wintergerste in einem statistisch relevanten Umfang erfolgte. Die meisten positiven Proben enthielten beide Mykotoxine in ähnlichen Konzentrationsbereichen. Die Proben, in denen

kein Citrinin nachgewiesen wurde, waren mit einer Ausnahme nur in geringem Umfang mit Ochratoxin A kontaminiert. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, daß beide Mykotoxine meist gleichzeitig vorliegen.

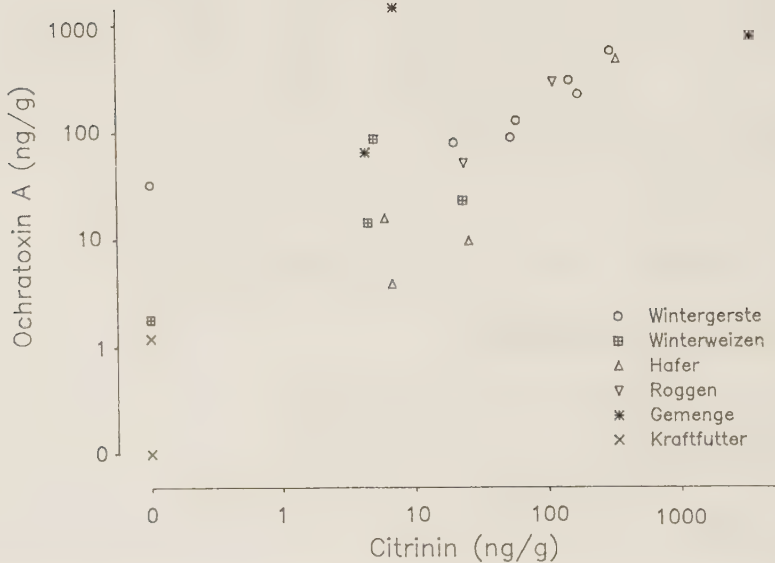


Abbildung 13: Citrinin- und Ochratoxin A-Gehalte (in ng/g) natürlich kontaminierter Proben (n = 21)

3.4 Vergleich zwischen ELISA und HPLC-Testsystemen zum Nachweis von Mykotoxinen in Zerealien

3.4.1 Zearalenon

3.4.1.1 Material und Methode

Aus dem zur Verfügung stehenden Probenmaterial wurden 16 Zearalenon positive, gemahlene Proben ausgewählt, im Waring Blender nochmals für 1 min. homogenisiert, mit der im Kapitel 3.2.2.1 beschriebenen Methode extrahiert und mittels ELISA auf Zearalenon untersucht. Teilproben wurden von Fr. Biber, Landesanstalt für Ernährung, München, mittels HPLC in Anlehnung an KAMIMURA et al. (1981) ebenfalls auf Zearalenon analysiert. Das Probenmaterial umfaßte acht Winterweizen-, drei Wintergerste-, drei Roggen- und zwei Sommergersteproben.

3.4.1.2 Ergebnisse

Trotz zweier unterschiedlicher Extraktions- und Nachweissysteme ergab sich eine hohe Korrelation beider Methoden ($r = 0,957$). In Abb. 14 sind die Ergebnisse graphisch wiedergegeben. Die Wiederfindungsraten wurden, da bei der HPLC Methode keine Angaben vorlagen, nicht berücksichtigt.

Wie aus Abb. 14 zu ersehen ist korrelierten beide Methoden in einem weitem Bereich (2 - 140 µg/kg) sehr gut miteinander. Allerdings traten, wie aus Tab. 21 zu ersehen ist, bei hoch kontaminierten Proben (> 400 µg/kg) beträchtliche Ergebnisdifferenzen auf. Eine plausible Erklärung hierfür könnten Verluste bei der säulenchromatographischen Reinigung des nach KAMIMURA et al. (1981) erhaltenen Extraktes sein.

Tabelle 21: Vergleich von Zearalenongehalten (in µg/kg) natürlich kontaminierter Zerealien bei Nachweis mittels ELISA und HPLC

Zearalenon (µg/kg)			Zearalenon (µg/kg)		
Substrat	ELISA	HPLC	Substrat	ELISA	HPLC
Sommergerste	2,1	5,2	Wintergerste	87,9	132,2
Sommergerste	4,0	u.N. ¹	Wintergerste	108,2	95,0
Winterweizen	5,1	9,9	Winterweizen	120,5	119,4
Roggen	14,0	28,7	Roggen	139,0	134,7
Winterweizen	21,9	19,9	Winterweizen	550,6	432,4
Winterweizen	23,3	27,0	Winterweizen	684,3	495,9
Wintergerste	43,8	41,5	Winterweizen	699,4	411,7
Roggen	71,1	98,9	Winterweizen	1050,0	478,5

1) = unter der Nachweisgrenze

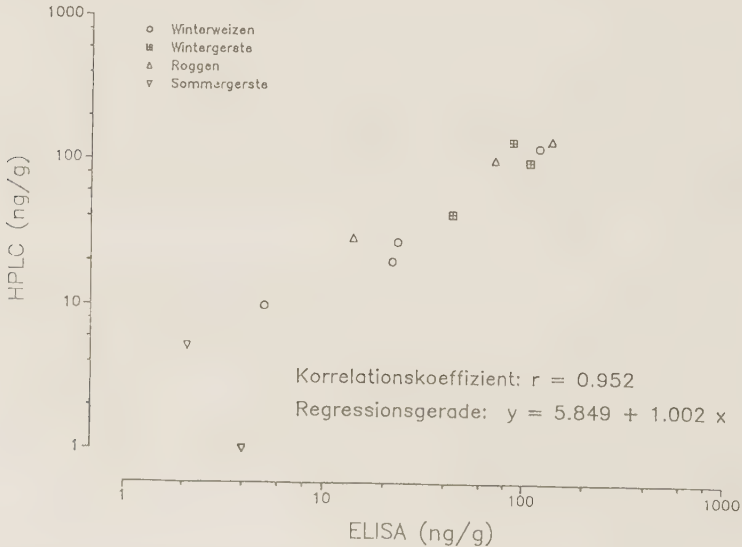


Abbildung 14: Korrelation zwischen enzymimmunologisch und hochdruckflüssigkeitschromatographisch ermittelten Zearalenon-Gehalten (in ng/g) natürlich kontaminierter Proben (n = 12)

3.4.2 Ochratoxin A

3.4.2.1 Material und Methode

Zur Absicherung enzymimmunologisch gewonnener Ergebnisse wurden 20 natürlicherweise mit Ochratoxin A kontaminierte Proben mit der im Kapitel 3.2.3.1 beschriebenen Methode extrahiert und mittels ELISA untersucht. Die gleichen Proben wurden desweiteren auf die im Kapitel 3.3.1.1. beschriebene Art und Weise extrahiert und mittels HPLC analysiert. Das Probenmaterial umfaßte sieben Wintergerste-, vier Hafer-, zwei Roggen- und zwei Getreidegemengeproben.

3.4.2.2 Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in Abb. 15 graphisch wiedergegeben. Die enzymimmunologisch ermittelten Ochratoxin A Gehalte der verschiedenen Proben lagen in einem Bereich von 1,2 - 757,8 µg/kg, die physikalisch-chemisch ermittelten in einem Bereich von 1,5 - 730 µg/kg. Trotz unterschiedlicher Extraktions- und Nachweissysteme korrelierten beide Methoden in einem weitem Bereich sehr gut miteinander; der Korrelationskoeffizient betrug 0,933. Wie anhand der Geradengleichung deutlich wird, wurden desweiteren mit beiden Nachweismethoden annähernd gleiche Ochratoxin A Gehalte in den untersuchten Proben nachgewiesen. Eine gute Vergleichbarkeit der enzymimmunologisch gewonnenen Ergebnisse mit den üblicherweise angewandten physikalisch-chemischen Nachweismethoden ist daher gewährleistet.

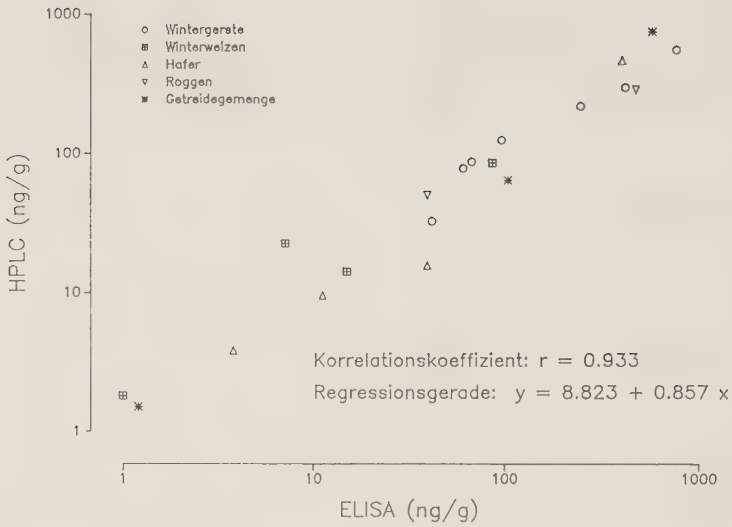


Abbildung 15: Korrelation zwischen enzymimmunologisch und hochdruckflüssigkeitschromatographisch ermittelten Ochratoxin A Gehalten (in ng/g) natürlich kontamierter Proben (n = 20)

3.5 Nachweis von Mykotoxinen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs mittels ELISA

3.5.1 Nachweis von Ochratoxin A in Schweinenieren

Da neben Zerealien vor allem Ochratoxin A-Rückstände im Fleisch von Schweinen die Hauptquelle für eine Kontamination des Menschen darstellen, wurde auch eine Extraktionsmethode für diese Probenmatrix entwickelt. Die zur Extraktion von Zerealien für den ELISA beschriebene Methode war für diese Probenmatrix nicht anwendbar.

3.5.1.1 Material und Methode

Schweinenieren wurden mit einem Mixer homogenisiert. 4 g des Homogenates wurden in ein 50 ml Zentrifugenglas abgewogen und mit 8 ml einer Pufferlösung (118,0 g NaCl, 33,72 ml H_3PO_4 ad 1000 ml A.dest., pH 1,6, eingestellt mit 1 m NaOH) versetzt (GAREIS et al., 1988). Nach 5 min Rühren wurde das pH mit 1 m HCl korrigiert. Dieser Ansatz wurde dann 1 h auf einem Magnetrührer gerührt und anschließend mit 10 ml Chloroform für 20 min. extrahiert. Die entstandene Emulsion wurde in der Kühlzentrifuge getrennt (4400 g, 20 min., 4 °C). Nach erfolgter Phasentrennung wurde die Chloroformphase über eine mit Oxalsäure vorbeschichtete Silicia Sep-pak Kartusche (vorgespült mit 4 ml Chloroform und anschließend trockengesaugt) gegeben. Die Kartusche wurde dann noch mit 5 ml Chloroform nachgespült und die gesammelten Chloroformfraktionen anschließend auf ca. 2 ml in einem Rotationsverdampfer eingeengt. Nach Ausschütteln des konzentrierten Chloroformextraktes mit 2 ml einer 0,13 m Natriumhydrogencarbonatlösung und nochmaliger Zentrifugation wurden 500 µl der erhaltenen wäßrigen Phase mit 250 µl einer 0,13 m Natriumhydrogencarbonatlösung verdünnt und in den ELISA eingesetzt (je zwei voneinander unabhängige Verdünnungen im Vierfachansatz).

3.5.1.2 Ergebnisse

Aufgrund der hohen Affinität des Ochratoxin A für Proteine war es nötig, das pH vor der Extraktion auf Werte unter 2,0 einzustellen. Durch die Verwendung der oxalsäurebeschichteten Kartusche war es möglich, den Chloroformrohextrakt soweit aufzureinigen, daß nach dem Ausschütteln des Eluates mit Natriumhydrogencarbonat der enzymimmunologische Nachweis durch noch vorhandene Probenbestandteile nicht mehr gestört wurde. Wichtig dabei ist, daß die Kartusche vor der Zugabe des Chloroformextraktes kein Lösungsmittel mehr enthält, da ansonsten das Eluat, das in diesem Fall eine bräunliche Färbung aufweist, in der nachfolgenden ELISA-Analyse falsch positive Ergebnisse bewirkt. Durch den Konzentrierungsschritt ist es möglich, auch noch Spuren von Ochratoxin nachzuweisen (Nachweisgrenze 0,1 µg/kg). Die Wiederfindungsraten lagen durchschnittlich bei 65,4% (Tab. 22).

Tabelle 22: Wiederfindungsraten von Ochratoxin A in künstlich kontaminierten Schweinenieren

Toxinzusatz (in ng/g)	x + s	Wieder- findung (%)	VK (%)	n
0,25	0,162 + 0,019	64,7	11,9	5
0,5	0,372 + 0,038	74,3	10,2	5
1,0	0,641 + 0,019	64,1	2,9	5
2,0	1,167 + 0,137	58,3	11,7	5

Zeichenerklärung siehe Tab. 17

3.5.2 Nachweis von Aflatoxin M_1 in natürlich kontaminierter Milch

Wie in Kapitel 2.2.1. beschrieben weist das Verhalten von AFM_1 in Milch und Milchprodukten einige Besonderheiten auf. Zum einen besteht eine Affinität zum Casein, zum anderen kommt es bei der Käseerzeugung zu einer AFM_1 -Zunahme. Alle vorliegenden Untersuchungen zu diesem Themenkomplex beruhen auf einer Extraktion des AFM_1 mit organischen Lösungsmitteln (Aceton, Chloroform, Dichlormethan) bzw. einer säulenchromatographischen Aufreinigung der Milch und anschließendem Nachweis mit physikalisch-chemischen Methoden (DC, HPLC). Da es mit dem ELISA möglich ist, AFM_1 in wäßrigen Lösungen direkt nachzuweisen, lag es nahe zu prüfen, inwieweit die Literaturangaben bestätigt werden können und ob der mit organischen Lösungsmitteln nicht extrahierbare Anteil mit dem enzymimmunologischen Nachweissystem detektiert werden kann.

3.5.2.1 Material und Methode

Zur Gewinnung einer natürlich kontaminierten Milch wurde am Lehr- und Versuchsgut der Fakultät in Oberschleißheim im September 1986 (1. Fütterungsversuch) einer Kuh (Rasse: Schwarzbunte x Holstein-Frisian; Lebendgewicht: ca. 600 kg; 4. Laktationsmonat; tägliche Milchleistung: 18,2 kg) 4,46 mg Aflatoxin B_1 oral in äthanolisch-wäßriger Lösung verabreicht und die Milch über einen Zeitraum von mehreren Tagen gesammelt. Im August 1987 wurden einer weiteren Kuh (tägliche Milchleistung: 21,5 kg; ansonsten wie oben) 4,23 mg Aflatoxin B_1 oral appliziert.

Alle Milchproben wurden vor der weiteren Aufbereitung entfettet (15 min. bei 2700 g und 4 °C).

Direkteinsatz der Milch im ELISA

Zum direkten Einsatz der Milch im ELISA wurden die Proben mindestens 1:20 in 0,1% Tween 20/PBS verdünnt. Auch die Standardkurve des ELISA wurde in 0,1% Tween 20/PBS angelegt.

Extraktion mit organischen Lösungsmittel

Zur Extraktion des AFM₁ mit organischen Lösungsmitteln wurden 3 ml entfetteter Milch mit 3 ml Dichlormethan versetzt, 1 min auf dem Vortex geschüttelt und nachfolgend zentrifugiert (15 min, 3500 g). Danach wurde der milchige Überstand abgekippt, die entstandene Emulsion durch kurzes Schütteln auf dem Vortex gebrochen und das Dichlormethan mit einer Pasteurpipette in ein weiteres Glasröhrchen überführt. Der Überstand und die Emulsionsreste wurden wieder vereinigt und noch zweimal mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten Dichlormethanextrakte wurden dann eingedampft und der Rückstand in 2 ml PBS mit 10% Methanolzusatz aufgenommen. Auch die Standards für den Einsatz im ELISA wurden in dieser Lösung angesetzt. Der milchige Überstand - nach dem Ausschütteln der Milch mit Dichlormethan - wurde wie oben beschrieben (Direkteinsatz der Milch) ebenfalls untersucht.

Säulenchromatographische Aufreinigung

Als dritte Methode wurde die von MÄRTLBAUER und TERPLAN (1985) beschriebene Aufreinigung der Milch mittels Sep-pak Kartuschen verwendet, die hier nochmals kurz beschrieben sei: die Milchprobe wird über eine Sep-pak C₁₈ Kartusche gegeben, interferierende Probenbestandteile mit 10% Acetonitril und AFM₁ mit 30% Acetonitril eluiert. Die durchschnittlichen Wiederfindungsraten lagen bei 94%.

Proteasebehandlung der Milch

3 ml entfetteter Milch wurden mit 1 mg Protease (gelöst in 1 ml PBS) versetzt und 16 h bei 37 °C inkubiert. Zur Enzymdenaturierung wurden die Proben anschließend eine halbe Stunde auf 90 °C erhitzt. Diese proteasebehandelte Milch wurde dann mit den drei oben beschriebenen Methoden auf ihren AFM₁-Gehalt untersucht.

3.5.2.2 Ergebnisse

Obwohl alle drei Methoden bei Vorversuchen mit künstlich kontaminierter Milch Wiederfindungsraten von annähernd 100% aufwiesen, ergaben sich bei der Bestimmung des AFM₁-Gehaltes natürlich kontaminierter Milch deutlich unterschiedliche Werte (Tab. 23). Bei der Extraktion mit Dichlormethan wurden durchschnittlich 36,4%, bei der säulenchromatographischen Aufreinigung 20,9% weniger AFM₁ detektiert als bei der Direktbestimmung. Weder der milchige Überstand nach dem Ausschütteln mit Dichlormethan, noch die jeweiligen Flüssigkeitsfraktionen bei der Sep-pak Aufreinigung (Milchdurchlauf, A.dest., 10% Acetonitril) enthielten mehr als 2 - 4% der Gesamtmenge an AFM₁. Die deutlich geringeren Werte bei den beiden Extraktionsmethoden sind also nicht auf Verluste bei der Aufreinigung zurückzuführen.

Da die Milchproben des ersten Fütterungsversuches vor der Untersuchung z.T. bis zu zehn Wochen bei -18 °C eingefroren waren, wurde das Probenmaterial des zweiten Versuches zum Ausschluß eventueller Einfriereffekte sofort nach Erhalt untersucht. Dabei erwies sich als wichtig, daß bei der Direktbestimmung die Milchproben vor dem Anlegen der Verdünnungsreihen zumindest Raumtemperatur aufweisen, da ansonsten nur AFM₁-Gehalte, die denen bei der Dichlormethanextraktion entsprechen, nachgewiesen werden.

Auch nach der Proteasebehandlung der frischen Milch war bei Anwendung der beiden Aufreinigungsmethoden keine Erhöhung der AFM₁-Löslichkeit feststellbar. Ebenso wie bei der unbehandelten Milch konnte nach dem Ausschütteln mit Dichlormethan AFM₁ in der wäßrigen Phase nur in Spuren nachgewiesen werden (ca. 2% der gesamten AFM₁-Menge).

Zusammenfassend ist festzustellen, daß etwa ein Drittel der AFM₁-Menge einer natürlich kontaminierten Milch mit der üblichen Extraktion nicht nachweisbar ist.

Tabelle 23: Enzymimmunologisch ermittelte Aflatoxin M₁-Gehalte natürlich kontaminierter Milch bei Verwendung verschiedener Aufbereitungsmethoden

	Zeit nach Applikation	Direktbestimmung AFM ₁ (in ng/l)	Sep-pak Aufreinigung AFM ₁ (in ng/l)	Extraktion mit Dichlormethan AFM ₁ (in ng/l)
		rel. %	rel. %	rel. %
1. Fütterungsversuch (4,46 mg Aflatoxin B ₁)	12 h	4767,8 ¹⁾	3799,9	3170,6
	24 h	2607,8	2086,2	1659,3
	36 h	1723,8	n.b. 2)	n.b.
	48 h	1020,1	n.b.	663,9
	60 h	493,6	394,9	265,0
2. Fütterungsversuch (4,23 mg Aflatoxin B ₁)	12 h	4424,9	3650,0	3030,0
	24 h	2142,0	1582,1	1368,7
	36 h	1187,1	929,4	n.b.
	48 h	811,0	698,0	n.b.
	60 h	439,4	345,1	n.b.
	72 h	303,3	214,5	n.b.
	84 h	128,8	104,8	n.b.

- 1) alle Werte sind Mittelwerte aus Doppel- oder Mehrfachbestimmungen
 2) n.b. = nicht bestimmt

3.5.3 Nachweis von Aflatoxin M_1 in verschiedenen Milchfraktionen

Da die im vorhergehenden Kapitel dargestellten Ergebnisse vermuten lassen, daß der nicht extrahierbare AFM_1 -Anteil mit dem ELISA-Verfahren nachweisbar ist, wurde zur weiteren Charakterisierung dieses Anteils eine Milchfraktionierung durchgeführt.

3.5.3.1 Material und Methode

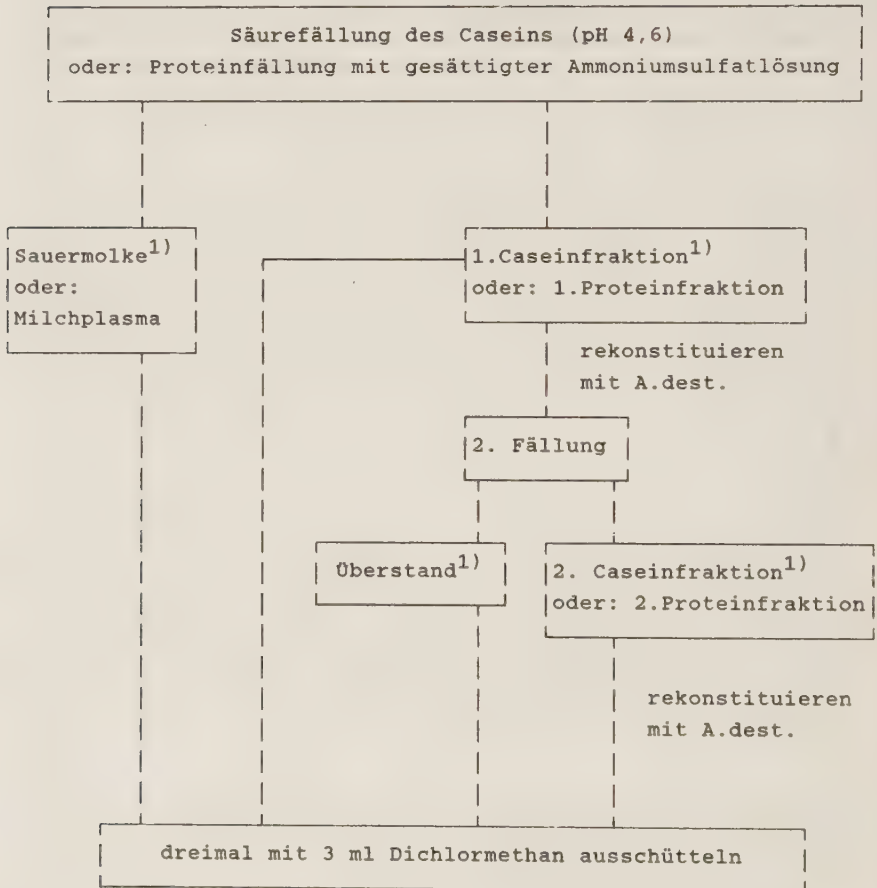
Natürlich kontaminierte, entfettete Milch wurde, wie in Abb. 16 schematisch dargestellt, fraktioniert. Da das Rekonstituieren des ausgefällten Caseins zu Suspensionen führt, ist bei der Direktbestimmung dieser Fraktion auf eine vollständige und homogene Verteilung zu achten. Zusätzlich zu der dort aufgeführten Direktbestimmung bzw. Extraktion mit Dichlormethan wurde -soweit möglich- auch eine Sep-pak Aufreinigung der einzelnen Fraktionen durchgeführt.

3.5.3.2 Ergebnisse

Insgesamt wurden vier natürlich kontaminierte Milchproben mit unterschiedlichen AFM_1 -Gehalten untersucht. In Tab. 24 sind anhand von zwei Milchproben die Ergebnisse exemplarisch wiedergegeben. Zur besseren Vergleichbarkeit der drei verwendeten Aufbereitungsmethoden wurde der bei der Direktbestimmung der Milch ermittelte AFM_1 -Gehalt gleich 100% gesetzt und alle anderen Werte prozentual darauf bezogen.

51,1 - 54,0% des AFM_1 verblieb bei der Säurefällung in der im Vergleich zur Sauermolke gewichtsmäßig viel geringeren Caseinfraktion. Wird das ausgefällte Casein in A.dest. rekonstituiert und nachfolgend durch Zentrifugation wieder abgetrennt, verbleibt nur mehr etwa die Hälfte dieses AFM_1 -Anteils in der 2.Caseinfraktion (24,1 - 31,0% der Gesamt- AFM_1 -Menge), der im übrigen vollständig dichlormethanolöslich ist. In zusätzlich durchgeführten Versuchen sollte geklärt werden, wie sich der in der 2.Caseinfraktion verbleibende Anteil bei mehrmaligem Wiederholen des Rekonstituierens verhält. Dabei ergab sich folgendes: nach drei-

Abbildung 16: Milchfraktionierung zur Bestimmung der Verteilung von Aflatoxin M₁



- ¹⁾ Aliquote dieser Fraktionen wurden jeweils in PBS mit 0,1% Tween 20 Zusatz verdünnt und in den ELISA eingesetzt (Direkteinsatz)
Mindestverdünnung: Sauermolke 1:20 Milchplasma 1:20
Caseinfraktion 1:25 Proteinfraktion 1:20
Überstand 1:5

maligem Waschen der 2. Caseinfraction mit A. dest. reduziert sich dieser Anteil auf 7,6 - 9,4% der Gesamt-AFM₁-Menge, wobei sich bei jedem Waschen der am Casein verbleibende Anteil um ca. 50% verringerte. Ein ähnlicher Reduzierungseffekt wurde auch dann erzielt, wenn die 1. Caseinfraction in der doppelten Menge A. dest. rekonstituiert wurde. Daraus ergibt sich, daß eine Affinität des AFM₁ zum Casein zwar vorhanden ist, es sich aber dabei eher um eine adsorptive Bindung handeln dürfte.

Auch nach der Milchfraktionierung sind nicht mehr als 68,6 - 70,3% des AFM₁ in einer natürlich kontaminierten Milch mit Dichlormethan extrahierbar. 54,7 - 66,0% dieses extrahierbaren Anteils (entspricht 36,4 - 46,6% der Gesamt-AFM₁-Menge) reichert sich bei der Säurefällung im Casein an. In den jeweils mituntersuchten wäßrigen Überständen nach dem Ausschütteln mit Dichlormethan konnte AFM₁ nur in Spuren nachgewiesen werden.

Der nicht extrahierbare AFM₁-Anteil, der aus der Differenz zwischen Methode A (Direktbestimmung) und Methode C (Ausschütteln mit Dichlormethan) rechnerisch ermittelt werden kann, verhielt sich bei der Säurefällung folgendermaßen: 60,6 - 67,5% dieses Anteils (entspricht 18,8 - 21,4% der Gesamt-AFM₁-Menge) verblieben in der Sauermolke; der restliche Anteil (10,3 - 12,2% der Gesamt-AFM₁-Menge) befand sich nach dem Rekonstituieren der Caseinfraction und erneuter Abtrennung im Überstand. Ein Teil dieses nicht extrahierbaren Anteils konnte mit der Sep-pak Aufreinigung nachgewiesen werden. Allerdings war keine Zuordnung dieses mit der Sep-pak C₁₈ Kartusche von der Probenmatrix abtrennbaren Anteils zu einer bestimmten Fraktion gegeben.

Bei der Fällung mit Ammoniumsulfat wird neben dem Casein noch ein als "Laktoglobulin" bezeichneter Anteil - nicht identisch mit dem elektrophoretisch abgrenzbaren Lactoglobulin - ausgefällt. Dies könnte die im Vergleich zur Säurefällung stärkere Anreicherung des AFM₁ in der Proteinfraction erklären. Da bei dieser Fällungsmethode die Wiederfindungsraten (Summe der Einzelfractionen) z.T. nicht befriedigend waren (<90%), konnte das Verhalten des nicht extrahierbaren AFM₁-Anteils nicht weiter charakterisiert werden.

Tabelle 24: Prozentuale Verteilung von Aflatoxin M₁ auf verschiedene Milchfraktionen bei Direktbestimmung (Methode A), Sep-pak Aufreinigung (Methode B) und Ausschütteln mit Dichlormethan (Methode C). Alle Werte sind Mittelwerte aus Doppel- oder Mehrfachbestimmung. Die bei der Direktbestimmung des Aflatoxin M₁-Gehaltes der unfraktionierten Milch ermittelten Ergebnisse sind gleich 100% gesetzt.

1. Milchprobe:

	AFM ₁ -Gehalt der Milch (ng/l)	% in Sauer- molke	% in 1. Casein- fraktion	% in Über- stand	% in 2. Casein- fraktion
<u>Säurefällung</u>					
Methode A	4767,8 = 100%	48,9	51,1	24,6	24,1
Methode B	3799,9 = 79,7%	35,6	- 1)	18,9	- 1)
Methode C	3170,6 = 66,5%	30,1	(36,4) 2)	12,4	24,0
<u>Proteinfällung mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung</u>					
		% in Milch- plasma	% in 1. Pro- teinfraktion	% in Über- stand	% in 2. Pro- teinfraktion
Methode A		30,5	61,6	14,2	42,8
Methode B		19,4	(62,6) 2)	16,0	46,6
Methode C		14,3	(55,3) 2)	12,7	42,6

1) nicht mit der Sep-pak Methode bestimmbar

2) rechnerisch ermittelte Werte (Summe aus Überstand und 2. Casein- bzw. Proteinfraktion)

Fortsetzung Tabelle 24:

2. Milchprobe:

	AFM ₁ -Gehalt der Milch (ng/l)	% in Sauer- molke	% in 1. Casein- fraktion	% in Über- stand	% in 2. Casein- fraktion
<u>Säurefällung</u>					
Methode A	493,6 = 100%	45,3	54,0	25,8	31,0
Methode B	394,6 = 80,0%	31,4	- 1)	16,3	- 1)
Methode C	265,0 = 53,7%	23,9	(46,4) 2)	15,5	30,9
<u>Proteinfällung mit gesättig- ter Ammoniumsulfatlösung</u>					
		% in Milch- plasma	% in 1. Pro- teinfraktion	% in Über- stand	% in 2. Pro- teinfraktion
Methode A		29,8	68,0	13,6	49,7
Methode B		17,7	(61,8) 2)	10,9	50,9
Methode C		14,2	(54,4) 2)	8,9	45,5

1) nicht mit der Sep-pak Methode bestimmbar

2) rechnerisch ermittelte Werte (Summe aus Überstand und 2. Casein- bzw. Proteinfraction)

3.5.4 Nachweis von Aflatoxin M_1 in künstlich kontaminiertem Käse

Um das Verhalten von AFM_1 bei Käseherstellung und -reifung untersuchen zu können, mußte zuerst eine Extraktionsmethode entwickelt werden. Um auch noch Spuren von AFM_1 im Käse nachweisen zu können, kann dabei ein Konzentrierungsschritt nicht umgangen werden, wobei sich wiederum Dichlormethan als leicht abdampfbare Flüssigkeit anbietet. Extrakte, die mit diesem Lösungsmittel gewonnen werden, weisen zudem nach ihrer Entfettung eine nur sehr geringe Tendenz zur unspezifischen Störung des enzymimmunologischen Nachweises auf.

3.5.4.1 Material und Methode

Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten wurden 2 g Käse mit den entsprechenden Toxinzusätzen versetzt. Das Methanol wurde anschließend unter Stickstoff abgedampft.

2 g Käse wurden in einen Stomacherbeutel eingewogen und nach Zugabe von 40 ml Dichlormethan 2 min im Stomacher extrahiert und anschließend filtriert. 10 ml des Extraktes wurden dann eingedampft. Der ölige Rückstand wurde in 0,5 ml Methanol, 0,5 ml PBS und 1 ml Heptan aufgenommen und anschließend 15 min bei 2700 g und 4 °C zentrifugiert. Ein Teil der unteren methanolisch-wässrigen Phase wurde dann vorsichtig mit einer Pasteurpipette entnommen und nach Einstellen des Methanolgehaltes auf 10% in den ELISA eingesetzt (je zwei voneinander unabhängige Verdünnungen im Vierfachansatz).

3.5.4.2 Ergebnisse

Bei Käseproben mit Schimmelpilzbewuchs an der Oberfläche (z.B. Brie, Camembert) ist es für die Untersuchung wichtig, keine Randstücke zu verwenden, da dies zu einer Störung des Testsystems führt. In Tab. 25 sind die Wiederfindungsraten für AFM_1 , das einem Camembert zugesetzt wurde, wiedergegeben. Sie betrug durchschnittlich 101,6% bei einem mittleren Variationskoeffizienten

von 11,0%. Die Wiederfindungsrate von über 100% bei den niedrigen Konzentrationen lassen eine geringfügige unspezifische Testbeeinflussung vermuten; das Ausgangsmaterial (nicht künstlich kontaminierte Probe) wies aber stets Werte unter der Nachweisgrenze (15 ng/kg) auf.

Neben Camembert wurden noch weitere Käsearten untersucht, allerdings nur unter dem Aspekt, ob deren Probenmatrix eine Störung des Testsystems verursacht. Dieser Effekt trat bei keiner der untersuchten Käsearten (Brie, Butterkäse, Tilsiter, Gouda, Emmentaler) in höherem Umfang auf, so daß die entwickelte Aufbereitungsmethode als Screening im Rahmen der lebensmittelhygienischen Überwachung von AFM₁-Gehalten im Käse geeignet erscheint. Mit dieser Methode ist es einer Laborkraft möglich, 30 Proben pro Tag zu extrahieren und zu untersuchen.

Tabelle 25: Bestimmung von Aflatoxin M₁ in künstlich kontaminiertem Camembert mittels ELISA

Toxinzusatz (pg/g)	x + s (pg/g)	Wieder- findung (%)	VK (%)	n
50	53,9 + 5,74	107,8	10,7	8
100	102,6 + 10,67	102,6	10,4	7
150	149,9 + 14,84	99,9	9,9	8
200	192,3 + 24,7	96,1	12,9	7

3.5.5 Nachweis von Aflatoxin M_1 in natürlich kontaminiertem Käse

3.5.5.1 Herstellung eines natürlich mit Aflatoxin M_1 kontaminierten Camembert

3.5.5.1.1 Material und Methode

Nach einem Fütterungsversuch mit Aflatoxin B_1 an zwei Milchkühen wurde die gewonnene natürlich kontaminierte Milch mit vorgereifter Kesselmilch verdünnt und daraus Camembert hergestellt. Die Käseherstellung wurde von Frau Degle an der Milchwirtschaftlichen Untersuchungs- und Versuchsanstalt, Kempten, durchgeführt. Folgende Bedingungen wurden bei der Herstellung gewählt:

- Verwendung vorgereifter Kesselmilch (3,5% Fett)
- zu 16 kg Milch: 16 ml Schimmelkulturaufschwemmung
6 ml mikrobielles Lab
- Einlabungstemperatur 34 °C
- Dicklegungszeit 50 min.

Die Untersuchung der Käseproben erfolgte mit der in Kapitel 3.5.4.1. beschriebenen Methode. Daneben wurde noch eine Proteasebehandlung des Käsebruches wie folgt durchgeführt:

2 g Käse wurden im Stomacher mit 15 ml Hexan für 2 min entfettet und anschließend filtriert. Die entfettete Käseprobe wurde dann 36 h bei Raumtemperatur unter Lichtabschluß getrocknet. Nach Zugabe von 10 ml PBS und 1 mg Protease (gelöst in 1 ml PBS) wurde der Ansatz 48 h bei 37 °C in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Nach Hitzedenaturierung der Protease wurden Aliquote des Ansatzes in PBS mit Zusatz von 0,1% Tween 20 verdünnt (Mindestverdünnung 1:10) und in den ELISA eingesetzt. 5 ml des Ansatzes wurden desweiteren zweimal mit 10 ml Dichlormethan ausgeschüttelt.

Die Molke wurde, nachdem Caseinreste durch Zentrifugation entfernt worden waren (15 min bei 900 g), wie im Kapitel 3.5.2.1 bei der Untersuchung der Milch beschrieben entweder direkt in den ELISA eingesetzt oder mit Dichlormethan ausgeschüttelt.

3.5.5.1.2 Ergebnisse

Die Tab. 26 zeigt die AFM_1 -Bilanz der Camembert-Herstellung unter Zugrundelegen der AFM_1 -Konzentration, die bei der Direktbestimmung der Milch ermittelt wurde. Wie im Kapitel 3.5.2.2. beschrieben, können aber nur etwa zwei Drittel des Gesamt- AFM_1 -Gehaltes der Milch mit Dichlormethan extrahiert werden. Da die Extraktion des Käsebruches ebenfalls mit Dichlormethan erfolgte, lassen die Wiederfindungsraten von nur 65,7 bis 68,9% bei der Bilanzierung der Käseherstellung vermuten, daß sich der gesamte, nicht extrahierbare AFM_1 -Anteil im Käse angereichert hat. Diese Vermutung wird erhärtet durch die Tatsache, daß bei der Untersuchung der Labmolke, im Gegensatz zur Sauermolke (siehe Kapitel 3.5.3.2.), kein Unterschied zwischen der Direktbestimmung und dem Ausschüteln mit Dichlormethan festgestellt werden konnte. Durch die Proteasebehandlung eines frischen Käsebruches gelang es, den nicht extrahierbaren Anteil soweit freizusetzen, daß er bei der Direktbestimmung im ELISA nachweisbar war. Beim Zugrundelegen der dadurch ermittelten AFM_1 -Konzentration im Käse lag die Wiederfindungsrate für den 2. Bilanzversuch bei 100,3%, wobei sich 73,4% des gesamten AFM_1 im Käse anreicherten. Allerdings war es nicht möglich, nach der Proteasebehandlung des Käses den freigewordenen Anteil mit Dichlormethan zu extrahieren. Desweiteren war es nicht möglich, diese Freisetzung bei einem Käsebruch, der drei Monate bei $-18^{\circ}C$ eingefroren war, zu wiederholen.

Tabelle 26: Aflatoxin M₁-Bilanz bei der Camembert-Herstellung

<u>1. Käseherstellung</u>				
	kg	AFM ₁ (ng/kg)	AFM ₁ -Gesamt (ng)	in %
Ansatz A				
Milch	16,05	134,7	2161,9	100
Molke	13,55 ²⁾	44,4	601,6	27,8
Käse	2,50	303,9	827,3	38,3
Wiederfindung ¹⁾				66,1
Ansatz B				
Milch	16,70	316,0	5277,2	100
Molke	14,00 ²⁾	103,3	1446,2	27,4
Käse	2,70	748,5	2021,0	38,3
Wiederfindung ¹⁾				65,7
<u>2. Käseherstellung</u>				
Milch	16,60	220,1	3653,7	100
Molke	13,37 ²⁾	73,6	984,0	26,9
Käse	3,23	474,9	1533,9	42,0
Wiederfindung ¹⁾				68,9
Bilanz dieses Versuches nach Proteasebehandlung des Käses und Direktbestimmung des AFM ₁ -Gehaltes				
Milch	16,60	220,1	3653,7	100
Molke	13,37 ²⁾	73,6	984,0	26,9
Käse	3,23	<u>829,9</u>	2680,6	73,4
Wiederfindung ¹⁾				<u>103,3</u>

1) Wiederfindung = $\frac{\text{ng AFM}_1\text{-Gesamt (Milch)}}{\text{ng AFM}_1\text{-Gesamt (Milch + Käse)}} \times 100$

2) Molke wurde nur rechnerisch bestimmt (kg Milch - kg Käse)

3.5.5.2 Nachweis von Aflatoxin M_1 während Reifung und Lagerung eines natürlich kontaminierten Camembert

3.5.5.2.1 Material und Methode

Nach der Bruchfällung wurde der Käse zum Abfließen der Restmolke 24 h bei 20 - 28 °C gelagert und anschließend für 1,5 h ins Salzbad verbracht. Nach einer Woche Reifung bei 16 - 17 °C wurde der Käse in Alufolie verpackt und ab dann bei 5 °C bis zur Durchreifung gelagert. Von der hergestellten Charge (acht Käse aus 16 kg Milch) wurde nach den in Tab. 16 angegebenen Tagen jeweils ein Käse zur Untersuchung auf den AFM_1 -Gehalt und für die Trockenmassebestimmung verwendet.

Beim Camembert verläuft die Reifung von außen nach innen. Bei obigen Reifungsbedingungen konnten nach ca. vier Wochen visuell folgende Zonen unterschieden werden: im äußeren Bereich des Käses die gereifte Zone, innen die ungereifte Zone ("grüner" Camembert) und dazwischen eine Übergangszone. Ab diesem Zeitpunkt wurden diese Zonen getrennt untersucht.

Bei der 2. Käseherstellung trat aufgrund einer Infektion mit coliformen Keimen eine Frühblähung auf, so daß bei diesem Käse das Verhalten von AFM_1 während der Reifung und Lagerung nicht untersucht werden konnte.

3.5.5.2.2 Ergebnisse

Um eine Vergleichbarkeit der AFM_1 -Gehalte des hergestellten Camembert über die gesamte Versuchsdauer zu gewährleisten, wurde eine Trockenmassebestimmung der Proben durchgeführt. Eine Übersicht des Verhaltens von AFM_1 während der Reifung und Lagerung gibt Tab. 27. Bis zum Zeitpunkt der Verpackung verringerte sich der AFM_1 -Gehalt der Proben - bezogen auf die Trockenmasse - um 16,6 - 23,3%. In der dritten bis vierten Woche nach Herstellung wurden die Ausgangswerte in etwa wieder erreicht.

Nach vier bis fünf Wochen war der Reifungsprozeß soweit fortgeschritten, daß sich gereifte und ungereifte Zonen bei der Probenentnahme trennen ließen. Bei der Untersuchung dieser Proben konnte in der Übergangszone eine Zunahme des AFM_1 -Gehaltes - bezogen auf die Trockenmasse - von 35,4 - 43,0% im Vergleich zum Ausgangswert festgestellt werden. Dies bedeutet, daß beim reifungsbedingtem Caseinabbau im Käse ein Teil des nicht extrahierbaren AFM_1 -Anteils dichlormethanolöslich wird. Unter Berücksichtigung der Käseherstellungsbilanz (siehe Kap.3.5.5.1.2.) wären allerdings Zunahmen des AFM_1 -Gehaltes bis zu 80% im Vergleich zum Ausgangswert möglich gewesen. Auch bei diesen Käseproben konnte nach einer drei- bis viermonatigten Lagerung bei -18°C die reifungsbedingte Zunahme des AFM_1 -Gehaltes nicht mehr nachvollzogen werden.

Beim vollgereiften Käse kommt es dann zu einer Abnahme des AFM_1 -Gehaltes bis zu 45,9% im Vergleich zum Ausgangswert. Inwieweit diese Abnahme auf einen Abbau von AFM_1 oder auf eine nicht mehr mit Dichlormethan extrahierbare neue Verbindung zurückzuführen ist, konnte nicht geklärt werden.

Die Mehrfachuntersuchung der natürlich kontaminierten Käseproben bestätigte im übrigen die Genauigkeit und Wiederholbarkeit der entwickelten Extraktionsmethode.

Tabelle 27: Aflatoxin M₁-Gehalte eines natürlich kontaminierten Camembert während Reifung und Lagerung

Zeit (d)	AFM ₁ (x + s) (ng/kg)	% zum Ausgangswert ¹⁾	VK (%)	Probenanzahl
<u>Ansatz A</u>				
0	303,9 + 38,80	100,0	12,8	5
1	286,6 + 15,08	96,8	5,3	4
9	322,8 + 11,24	83,4	3,5	4
17	366,9 + 19,06	90,0	5,2	4
24	372,8 + 9,36	91,6	2,5	4
31 2)	213,0 + 9,69	55,6	-	2
3)	546,0 + 20,12	135,4	-	2
4)	472,3 + 8,98	117,1	-	2
49 2)	260,0 + 15,23	67,9	-	2
3)	465,6 + 8,23	116,1	-	2
4)	468,0 + 10,78	116,1	-	2
64	240,1 + 42,67	60,4	17,8	5
<u>Ansatz B</u>				
0	748,5 + 49,00	100,0	6,4	5
1	777,0 + 43,51	95,9	5,6	4
9	802,2 + 19,03	77,1	2,4	7
17	1045,9 + 58,37	94,4	5,6	4
24	1096,9 + 46,24	100,8	4,2	4
31 2)	872,2 + 34,16	85,8	-	2
3)	1503,0 + 34,16	143,0	-	2
4)	1207,9 + 18,17	114,9	-	2
49 2)	745,3 + 48,51	73,3	-	2
3)	1455,5 + 28,39	139,3	-	2
4)	1245,6 + 71,49	119,2	-	2
64	555,0 + 20,90	54,1	3,8	3

1) unter Berücksichtigung der Trockenmasse

2) gereifte Käsezone 3) Übergangszone 4) ungereifte Käsezone

3.6 Anwendung der entwickelten Extraktionsmethoden

3.6.1 Nachweis von Mykotoxinen in Hafer und Winterweizen aus der besonderen Ernteerhebung der Jahre 1987 und 1988 mittels ELISA

3.6.1.1 Material und Methode

Aus der alljährlich von den Landwirtschaftsämtern durchgeführten besonderen Ernteerhebung, die zur statistischen Feststellung des Ernteertrages dient, wurden von Herrn Dr. Süß, Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, Freising, in den Jahren 1987 und 1988 Winterweizen- und Haferproben aus bayerischen Anbaugebieten zur Verfügung gestellt. Die Getreideproben wurden, wie in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben, extrahiert und mittels ELISA auf T-2 Toxin, Zearalenon und DAS untersucht.

3.6.1.2 Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in der Tab. 28 aufgeführt. Während die Haferproben der Jahre 1987 und 1988 zu einem hohen Anteil mit T-2 Toxin kontaminiert (59,2% bzw. 100%) waren, konnte in den Weizenproben der beiden Jahre nur eine geringe Kontaminationshäufigkeit (6,3% bzw. 12%) festgestellt werden. Die Belastung mit T-2 Toxin im Hafer des Jahres 1987 lag in einem Bereich von 2,3 - 118,7 µg/kg bei einem Durchschnittswert von 31,3 µg/kg, bzw. 1988 von 4,6 - 287,2 µg/kg, bei einem Durchschnittswert von 59,3 µg/kg. Die Verteilung der Kontaminationshäufigkeit in den einzelnen Konzentrationsbereichen ist in Abb. 17 dargestellt.

Während die Weizenproben des Jahres 1987 zu einem großen Anteil (66,7%) mit Zearalenon kontaminiert waren, konnte dieses Toxin 1988 nur in 4% der Proben nachgewiesen werden. Mykologische Untersuchungen (SÜSS, 1988) ergaben, daß 1987 *F. culmorum* - ein Zearalenon- und Deoxynivalenolbildner -, 1988 dagegen *F. poae* - ein T-2 Toxinbildner - vorherrschte. Wie aus Abb. 18 zu ersehen ist, war die Mehrzahl der Proben des Jahres 1987 nur gering kontaminiert; 16,7% der Proben enthielten jedoch mehr als 20 µg/kg

Tabelle 28: Vorkommen von T-2 Toxin, Zearalenon und DAS in Hafer- und Winterweizenproben aus der besonderen Ernteer- mittlung der Jahre 1987 und 1988 unter Berücksich- tigung der Wiederfindungsraten (s. Kap. 3.2.2.2)

			n	n _{pos}	x	x _{max}
			(in µg/kg)			
T-2 Toxin	Hafer	1987	49	29	31,3	118,7
		1988 ¹⁾	30	30	59,3	287,2
	Weizen	1987	48	3	4,5	4,8
		1988	50	6	4,9	7,8
Zearalenon	Hafer	1987	49	14	8,4	14,8
		1988 ¹⁾	30	30	23,4	74,3
	Weizen	1987	48	32	13,0	44,2
		1988	50	2	4,6	5,2
DAS	Hafer	1987	49	4	9,7	15,5
		1988 ¹⁾	30	6	11,5	16,6
	Weizen	1987	48	3	4,3	4,7
		1988	50	1	-	3,2

Zeichenerklärung:

n = Probenanzahl

$n_{\text{pos.}}$ = Anzahl positiver Proben (>2 ppb)

$\bar{x}$ = Mittelwert der positiven Proben

 $x_{\max.}$ = höchster Einzelwert

- 1) bei den Haferproben des Jahres 1988 erfolgte eine Vorauswahl unter mykologischen Gesichtspunkten, d.h. vor allem Proben mit starkem Fusarienbefall wurden untersucht

Zearalenon bei einem Maximalwert von 44,2 µg/kg. Bei den Haferproben der beiden Jahre ergab sich allerdings ein gegenteiliges Bild: im Jahre 1987 waren 28,6% der Proben mit Zearalenon belastet, 1988 dagegen 100%. Die höhere Kontaminationshäufigkeit des Hafers im Jahre 1988 schlägt sich auch in höheren Durchschnittswerten (23,4 µg/kg) und Maximalwerten (74,3 µg/kg) nieder. Einen Vergleich gibt Abb. 19.

DAS konnte nur im Hafer des Jahres 1988 in einem höherem Umfang (20%) nachgewiesen werden.

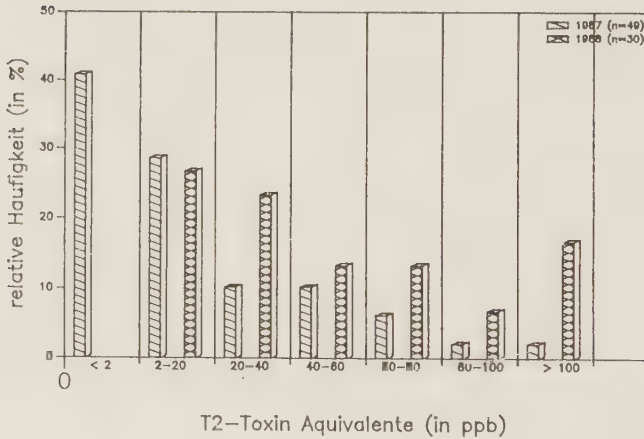


Abbildung 17: Vorkommen von T-2 Toxin (in µg/kg) in Haferproben aus der besonderen Ernteerhebung der Jahre 1987 und 1988

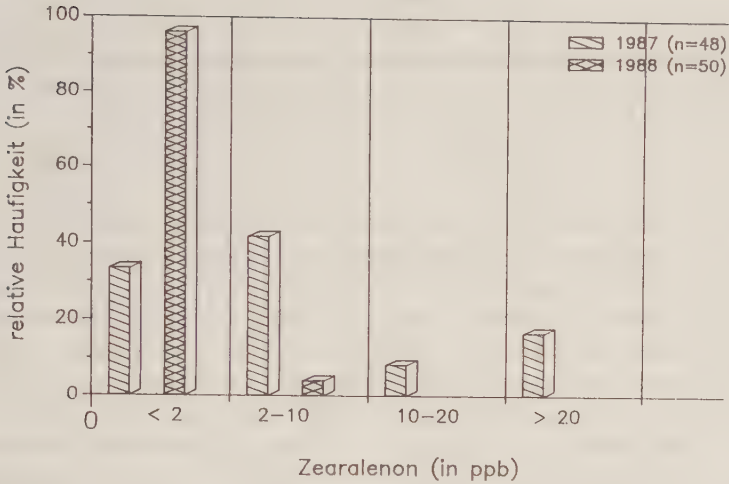


Abbildung 18: Vorkommen von Zearalenon (in $\mu\text{g/kg}$) in Winterweizenproben aus der besonderen Ernteerhebung der Jahre 1987 und 1988

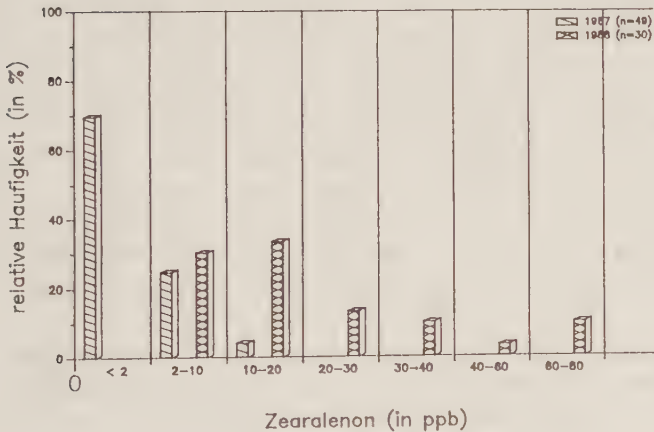


Abbildung 19: Vorkommen von Zearalenon (in $\mu\text{g/kg}$) in Haferproben aus der besonderen Ernteerhebung der Jahre 1987 und 1988

3.6.2 Nachweis von Mykotoxinen in Verdachtsproben der Ernte 1987 mittels ELISA

3.6.2.1 Material und Methode

1987 kam es in Bayern aufgrund eines regenreichen Sommers zu einem starken Auftreten der partiellen Taubährikeit, einer fusarienbedingten Getreideerkrankung. Dies veranlaßte die zuständigen Stellen zu prüfen, inwieweit dieses Krankheitsbild der Pflanzen Einfluß auf den Mykotoxingehalt im Getreide hat. Die Proben wurden auf deutlich mit Fusarien befallenen Feldern gezogen, getrocknet und an unserem Institut mittels ELISA, wie oben beschrieben, auf Mykotoxine analysiert. Die Untersuchungen umfaßten 106 Winterweizen-, 46 Wintergerste-, 31 Roggen- und 7 Haferproben und wurden von Herrn Dr. Süß, Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, Freising, zur Verfügung gestellt.

3.6.2.2 Ergebnisse

Da zum einem die Proben gezielt unter dem Aspekt einer möglichen Mykotoxinbelastung gezogen wurden, zum anderem *F. culmorum* als häufigste Pilzart isoliert wurde, ist die hohe Kontaminationshäufigkeit der Proben mit Zearalenon nicht unerwartet. 76,4% der Winterweizen-, 73,9% der Wintergerste-, 80% der Roggenproben und 85,7% der Haferproben enthielten Zearalenon (Tab. 29). Unterschiede zwischen den einzelnen Getreidearten werden anhand des Durchschnittswertes und des Belastungsprofils (Abb. 20) deutlich. Während alle positiven Haferproben nur sehr gering kontaminiert waren (Maximalwert 8,8 µg/kg), enthielten 16,1% der Winterweizen- und 10,9% der Wintergersteproben mehr als 250 µg/kg Zearalenon.

T-2 Toxin konnte in größeren Mengen nur in den Haferproben nachgewiesen werden; 85,7% waren positiv; der Durchschnittswert betrug 50,0 µg/kg, der Maximalwert 94,8 µg/kg. Alle anderen Proben enthielten kein bzw. in nur geringen Mengen (< 5 µg/kg) T-2 Toxin.

Tabelle 29: Vorkommen von Zearalenon in den Proben von fusarien-befallenen Feldern des Jahres 1987 unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten (s. Kap. 3.2.2.2)

	n	n _{pos.}	x _{min.}	x _{max}	x
Winterweizen	106	81	2,2	1560,8	209,4
Wintergerste	46	34	3,0	1029,4	103,2
Roggen	31	22	2,4	209,2	45,2
Hafer	7	6	4,0	8,8	6,9

Zeichenerklärung:

n = Probenanzahl

n_{pos.} = Anzahl positiver Proben (> 2µg/kg)

x_{min.} = kleinster gefundener Wert (in µg/kg)

x_{max.} = gefundener Maximalwert (in µg/kg)

x = Durchschnittswert der positiven Proben (in µg/kg)

40 Winterweizenproben aus verschiedenen Gebieten Bayerns wurden auf Aflatoxin B₁ untersucht. Von 22 Proben aus Oberbayern waren 3 positiv, bei einem Durchschnittswert von 2,6 µg/kg; 7 Proben aus Oberfranken enthielten kein Aflatoxin B₁ (Nachweisgrenze 1 µg/kg). Dagegen waren von elf Proben aus dem Schweinfurter und Würzburger Raum zehn mit Aflatoxin B₁ belastet in einem Bereich von 2,0 - 4,0 µg/kg bei einem Durchschnittswert von 3,1 µg/kg.

DAS konnte in keiner der 190 Proben nachgewiesen werden. Zehn zufällig ausgewählte Proben wiesen keinerlei Belastung mit Roridin A auf. Auch Ochratoxin A konnte in 30 untersuchten Proben nicht nachgewiesen werden (Nachweisgrenze 1 µg/kg).



Abbildung 20: Vorkommen von Zearalenon (in $\mu\text{g/kg}$) in Verdachtsproben der Ernte 1987

3.6.3 Nachweis von Mykotoxinen in Lagerproben aus Problembetrieben mittels ELISA

3.6.3.1 Material und Methode

Von den zuständigen Landwirtschaftsämtern wurden von Oktober 1987 bis Mai 1988 aus bayerischen landwirtschaftlichen Betrieben, in denen vermehrt Probleme wie Infertilitäten, reduzierte Gewichtszunahmen oder erhöhte Krankheitsanfälligkeit auftraten, Getreideproben gezogen und von Herrn Dr. Richter, Bayerische Landesanstalt für Tierzucht, Grub, an unser Institut zur Untersuchung auf Mykotoxine weitergeleitet. Es handelte sich dabei um 57 Winterweizen-, 46 Hafer-, 37 Wintergerste-, 15 Sommergerste-, 9 Sommerweizen-, 9 Getreidegemenge- und 4 Roggenproben.

3.6.3.2 Ergebnisse

Eine Übersicht der Ergebnisse bietet Tab. 30. Die Ochratoxin A Kontamination der Proben nimmt in Abhängigkeit von der Lagerzeit zu wie Abb. 21 anhand einiger Getreidearten zeigt. Drei bis vier Monate nach der Ernte waren von 13 untersuchten Wintergersteproben fünf positiv, bei einem Maximalwert von 20,2 µg/kg, von 29 Winterweizenproben nur drei positiv, bei einem Maximalwert von 44 µg/kg, und von 13 Haferproben keine. Demgegenüber wiesen die im Februar bis April 1988, also nach 6 - 10 Monaten Lagerzeit, gezogenen Proben eine erheblich höhere Belastungsfrequenz auf, was besonders am Beispiel der Wintergerste deutlich wird. Von 24 Proben waren 15 Ochratoxin A positiv, davon enthielten wiederum 6 Proben mehr als 50 µg/kg. Der Maximalwert lag bei 587,7 µg/kg. Auch bei Hafer und Winterweizen stieg der Anteil positiver Proben, die jedoch meist geringere Belastungswerte aufwiesen. Mit Ausnahme des Sommerweizens ergab sich bei allen anderen Getreidearten ein ähnliches Bild. Die hohe Belastung der Getreidegemenge mit Ochratoxin A ist wohl zum einen darauf zurückzuführen, daß versucht wurde minderwertiges Getreide zu verschneiden, zum anderen auf den Anteil an Wintergerste, den diese Mischungen enthielten. Die Anzahl der Roggenproben ist zu gering, um von einer

Tabelle 30: Mykotoxinbelastung von in Problembetrieben nach unterschiedlichen Lagerzeiten gezogenen Getreideproben unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten s. Kap. 3.2.2.2)

	OCHRATOXIN A				
	n	%pos.	x _{min.}	x _{max.}	x
Winterweizen	57	21,1	1,3	45,8	7,2
Wintergerste	37	54,1	1,4	587,7	92,1
Roggen	4	75,0	9,6	286,7	114,3
Hafer	46	26,1	4,8	441,8	49,9
Sommergerste	15	20,0	1,6	68,9	24,1
Sommerweizen	9	-	-	-	-
Getreidegemenge	9	77,8	2,0	2388,7	424,2
	ZEARALENON				
	n	%pos.	x _{min.}	x _{max.}	x
Winterweizen	57	89,5	3,9	413,3	58,9
Wintergerste	37	91,9	2,9	1518,8	142,8
Roggen	4	100,0	2,1	285,8	74,1
Hafer	46	97,8	3,1	423,4	26,5
Sommergerste	15	53,3	2,6	231,9	45,4
Sommerweizen	9	66,7	5,1	73,7	23,8
Getreidegemenge	9	100,0	3,2	1446,4	194,5
	T-2 TOXIN				
	n	%pos.	x _{min.}	x _{max.}	x
Winterweizen	57	19,3	2,2	26,1	6,1
Wintergerste	37	32,4	2,6	8,1	3,9
Roggen	4	-	-	-	-
Hafer	46	95,7	2,8	385,1	35,3
Sommergerste	15	53,3	2,3	29,7	11,2
Sommerweizen	9	33,3	2,1	4,8	3,5
Getreidegemenge	9	88,9	2,5	36,2	10,2

Zeichenerklärung:

n = Probenanzahl

%pos. = prozentualer Anteil positiver Proben

x_{min.} = niedrigste nachgewiesene Kontamination (in µg/kg)

x_{max.} = höchster gefundener Wert (in µg/kg)

x = arithmetischer Mittelwert der positiven Proben

besonderen Anfälligkeit dieses Getreides zu sprechen.

Das gesamte Probenmaterial wies eine hohe Belastungsfrequenz mit Zearalenon auf. Auch hier war v.a. die Wintergerste hoch kontaminiert, bei der 18,9% der Proben mehr als 250 µg/kg enthielten. Die Verteilung der Kontaminationshäufigkeit in den einzelnen Konzentrationsbereichen war im übrigen der bei den Verdachtsproben gezeigten Struktur sehr ähnlich, so daß hier auf eine Wiedergabe verzichtet wurde. Die im Vergleich zu den Feldproben höhere Zearalenonbelastung des Hafers könnte während der Lagerung entstanden sein. Andererseits war bei den Verdachtsproben die Probenanzahl sehr gering, so daß dieser Belastungsanstieg auch einen zufälligen Befund darstellen könnte, zumal - ebenfalls im Vergleich zu den Feldproben - die Kontamination des Winterweizens bei den Lagerproben sogar geringer war.

T-2 Toxin konnte auch bei diesem Probenmaterial in hoher Frequenz und ausgeprägtem Umfang nur im Hafer detektiert werden.

DAS konnte in keiner Probe in nennenswertem Umfang nachgewiesen werden.

Bemerkenswert ist noch, daß vier der stark mit Ochratoxin A belasteten Proben (> 50 µg/kg) daneben noch in erheblichen Mengen Zearalenon (115,4 - 1518,8 µg/kg) enthielten. Eine Haferprobe war gleichzeitig mit 385,1 µg/kg T-2 Toxin und 441,8 µg/kg Ochratoxin A kontaminiert. Diese hohen Mykotoxingehalte dürften sicherlich auf eine unsachgemäße Lagerung zurückzuführen sein.

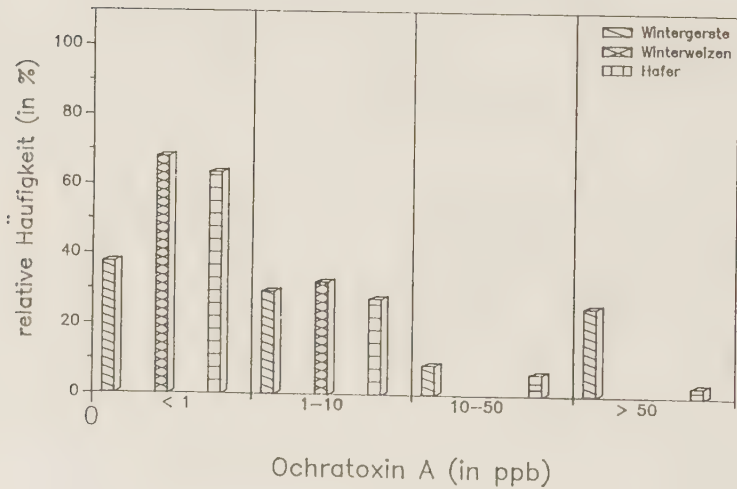
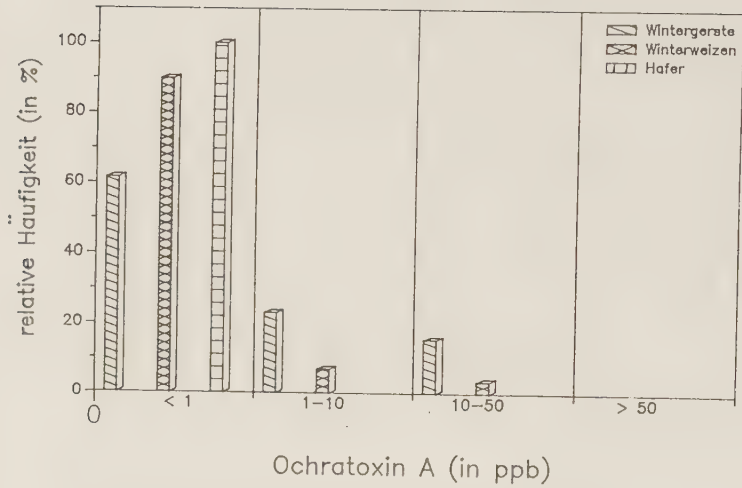


Abbildung 21: Vorkommen von Ochratoxin A (in $\mu\text{g/kg}$) in Getreidelagerproben

A: nach drei Monaten Lagerzeit

B: nach sechs Monaten Lagerzeit

3.6.4 Nachweis von Mykotoxinen in Mehlproben

3.6.4.1 Material und Methode

Im Juni 1988 wurden in verschiedenen bayerischen Mühlen 93 Weizenmehle, Type 550, und 25 Weizenvollkornmehle gesammelt und an unserem Institut nach der im Kapitel 3.2.2.1. beschriebenen Methode auf Zearalenon und T-2 Toxin mittels ELISA untersucht.

3.6.4.2 Ergebnisse

Wie bei den Proben der besonderen Ernteerhebung, die ebenfalls nach dem Zufälligkeitsprinzip gezogen wurden und von daher eine Aussage über die durchschnittliche Belastung von Zerealien mit den von uns untersuchten Mykotoxinen erlauben, waren auch die Weizenmehlproben zu einem hohen Prozentsatz mit Zearalenon kontaminiert (82,8% bzw. 96% bei Vollkornmehlen), bei allerdings geringen Durchschnittswerten (6,7 bzw. 12,7 µg/kg) und niedrigen Maximalwerten (43,2 bzw. 48,3 µg/kg). Die niedrigeren Durchschnittswerte beim Weizenmehl, Type 550, im Vergleich zu den Vollkornmehlen lassen sich durch die Entfernung der äußeren Kornschichten beim Mahlvorgang erklären.

Die Belastungshäufigkeit der Mehlproben, Type 550, mit T-2 Toxin betrug 10,8%. Unter Berücksichtigung des Maximalwertes von 6,3 µg/kg ist die Kontamination der Mehlproben als minimal einzustufen. Bei den Vollkornmehlen enthielten allerdings 60% der Proben T-2 Toxin, aber auch nur in sehr geringen Konzentrationen (Maximalwert 6,8 µg/kg). Diese hohe Belastungsfrequenz im Gegensatz zu den Mehlproben, Type 550, könnte durch den vorhandenen geringen Anteil von *F. poae* an der Mykoflora erklärt werden. Diese Pilzart ist für ihre mehr saprophytische Lebensweise auf Getreidekörnern bekannt, im Gegensatz zu dem invasiven Charakter von *F. culmorum*.

Eine Übersicht der Ergebnisse bietet Tab. 31.

Tabelle 31: Zearalenon- und T-2 Toxin-Gehalte (in $\mu\text{g/kg}$) von im Juni 1988 untersuchten Weizenmehlen, Type 550, und Weizenvollkornmehlen unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten (s. Kap. 3.2.2.2)

		n	n _{pos.}	x _{min.}	x _{max.}	x
Zearalenon	Mehl (Type 550)	93	77	2,2	43,2	6,7
	Vollkornmehl	25	24	2,3	48,3	12,7
T-2 Toxin	Mehl (Type 550)	93	10	3,0	6,3	4,1
	Vollkornmehl	25	15	3,4	6,8	4,4

Zeichenerklärung siehe Tab. 30

3.6.5 Nachweis von Mykotoxinen in zerealienhaltigen Lebensmitteln

3.6.5.1 Material und Methode

Von Juni bis Juli 1988 wurden Zerealien (Weizen, Roggen etc.), die für den menschlichen Verzehr bestimmt waren, und zerealienhaltige Lebensmittel unterschiedlicher Art und Herkunft auf ihren Gehalt an T-2 Toxin, DAS, Zearalenon und Aflatoxin B₁ untersucht. Insgesamt wurden 69 Proben analysiert.

3.6.5.2 Ergebnisse

Die Aufschlüsselung des Probenmaterials und Darstellung der Ergebnisse enthält Tab. 32.

47,8% der untersuchten Lebensmittel wiesen Zearalenon-Gehalte von 2,9 - 21,8 $\mu\text{g/kg}$ auf. Der Durchschnittswert betrug 6,0 $\mu\text{g/kg}$.

T-2 Toxin konnte, wie aufgrund der Getreide- und Mehlauf Untersuchungen zu erwarten war, in Weizenkleie und Lebensmittel mit Haferanteilen nachgewiesen werden. Daneben waren noch zwei Hirseproben

Tabelle 32: Zearalenon und T-2 Toxin Gehalte (in µg/kg) von im Frühjahr 1988 untersuchten Lebensmitteln unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten (s. Kap. 3.2.2.2)

	ZEARALENON				
	n	n _{pos.}	x _{min.}	x _{max.}	x
Zerealien	24	9	2,9	14,0	5,9
Vollkornbrote	8	6	3,3	21,8	7,2
sonstige Vollkornprodukte	9	6	3,6	10,9	6,3
Müsli	9	3	3,1	4,9	3,9
Haferflocken	7	3	3,6	6,7	5,6
Weizenkleie	2	2	6,7	8,0	7,3
Sonstige	10	4	4,3	5,6	4,8
	T-2 TOXIN				
Zerealien	24	2	6,8	7,2	7,0
Vollkornbrote	8	1	2,8	-	-
sonstige Vollkornprodukte	9	-	-	-	-
Müsli	9	2	3,8	6,3	5,0
Haferflocken	7	2	5,5	5,5	5,5
Weizenkleie	2	2	7,2	8,7	7,9
Sonstige	10	-	-	-	-

Zeichenerklärung siehe Tab. 29

in einem Bereich von 6,8 - 7,2 µg/kg positiv. 15,0% des gesamten Probenmaterials enthielt T-2 Toxin in einem Bereich von 2,8 - 8,7 µg/kg; der Durchschnittswert betrug 5,6 µg/kg.

DAS und Aflatoxin B₁ konnte in keiner Probe nachgewiesen werden.

4 Diskussion

Mykotoxine, Sekundärmetaboliten ubiquitär verbreiteter Schimmelpilze, besitzen eine Vielzahl von biologischen Eigenschaften, wie Zytotoxizität, Mutagenität und Kanzerogenität. Zu den am häufigsten in Zerealien nachweisbaren Mykotoxinen gehören die stark hepatotoxischen und kanzerogenen Aflatoxine, das nephrotoxische und kanzerogene Ochratoxin A, das östrogen wirksame Zearalenon und die zytotoxischen Trichothecene. Durch die Aufnahme von mit Mykotoxinen kontaminierten Futtermitteln durch landwirtschaftliche Nutztiere kommt es zu einem Übergang in Lebensmittel tierischen Ursprungs. Von besonderer Bedeutung sind hier Ochratoxin A Rückstände im Schweinefleisch und die Kontamination der Milch mit AFM₁.

Die potentielle Gefährdung der menschlichen Gesundheit durch Mykotoxine in Lebensmittel tierischen und pflanzlichen Ursprungs läßt es ratsam erscheinen, regelmäßige Untersuchungen durchzuführen. Um den Schutz des Verbrauchers hinreichend zu gewährleisten, sind schnelle und einfache Analysenmethoden nötig, die einen hohen Probendurchsatz ermöglichen und gleichzeitig ausreichende Nachweisempfindlichkeit und Spezifität bieten. Enzymimmunologische Nachweisverfahren erfüllen diese Bedingungen weitgehend; einem Einsatz in der Lebensmittelanalytik steht jedoch bisher - abgesehen davon, daß erst wenige "Testkits" kommerziell verfügbar sind - in vielen Fällen das Fehlen von geeigneten Probenaufbereitungsverfahren entgegen. Solche Verfahren sollten idealerweise für alle Substrate anwendbar sein und trotz der komplexen Probenmatrix von Lebensmitteln unspezifische Störungen des Testsystems durch mitextrahierte Lebensmittelkomponenten, d.h. in der Regel falsch positive Ergebnisse, ausschließen (LÜTHY und WINDEMANN, 1987).

4.1 Entwicklung von Extraktions- und Aufbereitungsverfahren für den Nachweis von Mykotoxinen in Lebensmitteln mittels ELISA

Der grundsätzliche Unterschied zwischen den Extraktionsverfahren für den physikalisch-chemischen und den immunologischen Nachweis

besteht darin, daß bei ersteren große Probenmengen (50-100 g) unter hohem Lösungsmittelverbrauch extrahiert und nach einem Clean-up auf ein kleines Endextraktvolumen konzentriert werden müssen, um den Nachweis der oft nur in Spuren vorliegenden Toxine überhaupt erst zu ermöglichen. Bei den immunologischen Verfahren dagegen können aufgrund der erheblich höheren Empfindlichkeit kleine Probenmengen unter Einsparung erheblicher Lösungsmittelmengen extrahiert werden und müssen üblicherweise danach nicht konzentriert werden, um Nachweisgrenzen zu erreichen, die denen der physikalisch-chemischen Methoden entsprechen. Die Untersuchung kleiner Probenmengen bedingt aber, daß großer Wert auf eine repräsentative Probennahme und auf eine ausreichende Homogenität einer größeren Teilprobe zu legen ist.

Bei Anwendung der enzymimmunologischen Nachweisverfahren kann es durch unspezifische Bindungen im Extrakt verbliebener Probenbestandteile an Testreagenzien zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Zur Bestätigung der Aufbereitungsverfahren, d.h. Vermeidung falsch positiver Ergebnisse bietet sich der Neutralisationstest an. Hierbei wird das in einem Extrakt vorliegende freie Toxin durch Zugabe von spezifischen Antikörpern gebunden, und der nach einer gewissen Inkubationszeit "mykotoxinfreie" Extrakt in den ELISA eingesetzt. Durch Vergleich der Extinktionswerte des unbehandelten, des mit einem Präimmunserum inkubierten und des "neutralisierten" Extraktes können Rückschlüsse auf Art und Umfang einer unspezifischen Hemmung des Testsystems gewonnen werden.

In dem von HEUSEL (1987) entwickelten und von RENZ (1989) übernommenen Neutralisationsverfahren ist eine konsekutive Testanordnung erforderlich, da bei einem simultanen Testansatz die dem Extrakt im Überschuß zugegebenen Antikörper mit dem gleichzeitig inkubierten Enzymkonjugat reagieren und folglich eine vollständige Hemmung des Substratumsatzes bedingen würden. Nun sind allerdings solche konsekutiven Testverfahren für manche der verwendeten ELISA's nicht beschrieben oder haben wie der für den Nachweis von Zearalenon publizierte konsekutive Test nur einen sehr eng umschriebenen Meßbereich. Desweiteren kommt bei der

Durchführung des konsekutiven Tests das Enzymkonjugat nicht mit dem Extrakt in Berührung; es erfolgt vor der Zugabe des Enzymkonjugates sogar noch ein zusätzlicher Waschschrift. Aus diesen Gründen sind die Ergebnisse eines so durchgeführten Neutralisationstestes nur eingeschränkt auf die Bedingungen, die bei einem simultanen Testansatz vorherrschen, übertragbar. Mit der Verwendung von Centricon Filtereinheiten zum Abtrennen der überschüssigen spezifischen Antikörper war es möglich, den Neutralisationstest unter den gleichen Testbedingungen durchzuführen, wie sie auch bei der späteren Bestimmung der Wiederfindungsraten vorherrschten sollten. Bei der Untersuchung einer natürlich mit Zearalenon kontaminierten Winterweizenprobe zeigte sich, daß der methanolisch-wäßrige Rohextrakt im ELISA eine unspezifische Beeinflussung des Testsystems hervorruft. Dies stimmt mit Ergebnissen von PESTKA et al. (1981) und RENZ (1989) überein.

Um diese unspezifische Störung auszuschließen gibt es verschiedene in der Literatur beschriebene Methoden (siehe Kapitel 2.3.1).

Der Vorteil derjenigen Methoden, die auf ein Clean-up des Rohextraktes verzichten, liegt natürlich in der sehr einfachen Probenaufbereitung. Die Testdurchführung mit hohen Methanolzusätzen stellt dabei zwar den einfachsten aller Lösungsvorschläge dar, führt aber zu einer nicht mehr akzeptablen Streubreite der Ergebnisse, wodurch die Aussagekraft des Nachweises erheblich reduziert wird (EL NAKIB et al., 1981; RAM et al., 1986; WARNER et al., 1986). Die Verwendung eines toxfreien Extraktes (SCHUBRING und CHU, 1988) zur Erstellung der Standardkurve hingegen bedingt, daß nur identische Proben, z.B. nur Weizen, auf einer Mikrotiterplatte untersucht werden können. Bei der Untersuchung von Lebensmitteln stößt dieses Verfahren aufgrund deren komplexer und schwer standardisierbarer Probenmatrix an die Grenzen. Zudem sind bei diesem Lösungsvorschlag falsch negative Ergebnisse nicht auszuschließen, da z.B. für die Trichothecene keine andere Nachweismethode mit entsprechender Empfindlichkeit vorhanden ist, so daß eine Überprüfung der "Toxinfreiheit" des Extraktes nicht möglich ist. Die "Verdünnungsmethode" (CHU et al., 1987; MORTIMER et al., 1987b; MILLS et al., 1988; RENZ, 1989) schließlich bedingt eine

hohe Nachweisgrenze und scheint nur für die Überwachung von gesetzlich festgelegten Grenzwerten oder bei Mykotoxikoseverdacht von Vorteil zu sein. Mit diesen bisher genannten Lösungsvorschlägen ist es aufgrund der Verwendung des methanolisch-wäßrigen Rohextraktes ohne weitere Aufbereitung nicht möglich Substrate zu untersuchen, die enzymhemmende Substanzen enthalten. Buchweizen oder buchweizenhaltige Lebens- und Futtermittel z.B. enthalten einen spezifischen Peroxidasehemmer, d.h. des Enzyms das bei den Mykotoxin-ELISA's fast ausschließlich für die Herstellung der Enzymkonjugate verwendet wird.

Öbliche Clean-up Methoden beruhen auf der Säulenchromatographie oder auf Flüssig-Flüssig Verteilungschromatographie. Aufgrund des hohen Probendurchsatzpotentials der enzymimmunologischen Nachweisverfahren erscheint die von PESTKA et al. (1981), ESGIN (1987) und RENZ (1989) angewandte Aufreinigung mittels Sep-pak C₁₈ Kartuschen aus Kosten- und Zeitgründen nicht praktikabel.

4.1.1 Aflatoxin B₁, Zearalenon, T-2 Toxin, Diacetoxyscirpenol und Roridin A in Zerealien

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellte Extraktionsmethode beinhaltet im Gegensatz zu den vorher erwähnten Methoden ein Clean-up durch Ausschütteln des methanolisch-wäßrigen Rohextraktes mit Dichlormethan und anschließender Entfettung. Daß durch diese Probenaufbereitung, unabhängig von der Probenmatrix, unspezifische Störungen des Testsystems nicht mehr auftraten, zeigten für Zearalenon durchgeführte Neutralisationstests. Für T-2 Toxin und DAS konnten keine Neutralisationstests durchgeführt werden, da die vorhandenen Antiseren nur eine sehr geringe Affinität zum freien Toxin aufweisen. Da aber der Enzymimmunotest für diese beiden Toxine, sowie der für Zearalenon, auf einer simultanen Testanordnung beruht, sind insofern die Ergebnisse des Neutralisationstests für Zearalenon auf diese beiden Enzymimmunoteste übertragbar. Für den enzymimmunologischen Nachweis von Roridin A und AFB₁ wird die doppelte Antikörpertechnik verwendet. Da bei der Untersuchung von Zerealien auf Roridin A keinerlei Hinweise auf eine unspezifische Hemmung des Testsystems auftraten, wurde

aufgrund der identischen Testanordnung für AFB₁ kein Neutralisationstest erstellt bzw. durchgeführt.

Durch das Ausschütteln des Rohextraktes mit Dichlormethan werden auch falsch positive Ergebnisse bei der Untersuchung von Buchweizen und buchweizenhaltigen Lebens- und Futtermitteln verhindert, wie sie bei der Verwendung des methanolisch-wäßrigen Rohextraktes auftraten.

Die geringen Wiederfindungsraten für AFB₁ (Tab. 13) sind insofern erstaunlich, da die sogenannte BF-Methode (WALTKING et al., 1968), die auf demselben Prinzip, nämlich Ausschütteln des methanolisch-wässrigen Rohextraktes beruht, bei Erdnüssen Wiederfindungsraten von mehr als 90% aufweist. Verantwortlich dafür, daß beim Ausschütteln nur etwas mehr als 50% des AFB₁ in die Dichlormethanphase übergehen, könnten Probenmatrixeffekte sein. Die höheren Wiederfindungsraten in der Gerste (68,3%) stellen hierfür ein Indiz dar; dasselbe Verhalten bei dieser Getreideart zeigt im übrigen Zearalenon.

Für die getesteten Trichothecene lagen die Wiederfindungsraten dagegen sehr hoch (89,0 - 93,5%); für Zearalenon betrugen sie 80,3%. In Untersuchungen von PESTKA et al. (1981), ESGIN (1987) und CHIBA et al. (1988), die jeweils die Wiederfindungsraten für T-2 Toxin in Weizen mittels ELISA bei Verwendung des methanolisch-wäßrigen Rohextraktes bestimmten, betrugen die entsprechenden Werte 87,5 - 122%. Wiederfindungsraten von über 100% berichten auch KLAFFER (1988) und MILLS et al. (1988) bei der Anwendung eines ELISA zum Nachweis von DAS bzw. WARNER et al. (1986) und RENZ (1989) bei Anwendung eines Zearalenon-ELISA.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode weist für die untersuchten Trichothecene weit bessere Nachweisgrenzen (1 - 2 µg/kg; für Roridin A 35 µg/kg) auf als vergleichbare Multimykotoxin-Methoden. Die Genauigkeit der Methode, ausgedrückt durch die Parameter Standardabweichung und Variationskoeffizient, liegt im Vergleich zu anderen beschriebenen enzymimmunologischen Nachweisverfahren sehr hoch.

Bei der Bewertung der durch Enzymimmuntests erzielten Ergebnisse sind stets auch die Kreuzreaktionen der verwendeten Antiseren zu berücksichtigen. Dies gilt insbesondere für die Antiseren gegen Trichothecene. So weist das Anti-T-2 Toxin-Serum zu HT-2 Toxin, das häufiger auch in Zerealien nachzuweisen ist, eine Kreuzreaktion von 40% auf. Durch die Verwendung zweier Enzymimmuntests mit Antiseren unterschiedlicher Spezifität, wäre es zwar möglich, wie von FAN et al. (1987) beschrieben, den jeweiligen Gehalt an T-2 Toxin und HT-2 Toxin rechnerisch zu ermitteln, dies würde aber den Analysenaufwand entsprechend erhöhen. Außerdem ist dieses Verfahren nur anwendbar, wenn tatsächlich nur T-2 und HT-2 Toxin in der Probe vorhanden sind. Jedes weitere kreuzreagierende Toxin in der Probe würde die Ergebnisse verfälschen. Weitere Kreuzreaktionen sind vom Anti-DAS-Serum (5,2% zu T-2 Toxin) und vom Anti-Zearalenon-Serum (41,6% zu α -Zearalenol) bekannt, wobei die Kreuzreaktion zum α -Zearalenon bei der Untersuchung von Zerealien kaum Bedeutung besitzt, da über das Vorkommen dieses Mykotoxins nur spärliche Berichte vorliegen (ENDERS, 1984). Das Anti-AFB₁-Serum ist dagegen hochspezifisch. Da aber die Aflatoxinverordnung neben AFB₁ auch die Aflatoxine B₂, G₁, G₂ umfaßt, wäre in diesem Fall ein Antiserum mit den entsprechenden Kreuzreaktionen zur Erstellung eines "Screening"-Testes durchaus vorteilhaft.

Enzymimmunologische Verfahren stellen als "Screening"-Verfahren für die Untersuchung großer Probenzahlen, z.B. im Rahmen von Monitoring-Programmen, die Methode der Wahl dar. Notwendig hierfür sind aufgrund des hohen Probendurchsatzpotentials dieser Verfahren geeignete Probenaufbereitungsmethoden. Mit der entwickelten Multimykotoxin-Extraktions- und Aufbereitungsmethode ist es möglich, Futter- und Lebensmittel unterschiedlicher Probenmatrix schnell (bis 60 Proben pro Tag und Laborkraft) und kostengünstig, gleichzeitig mit hoher Nachweissicherheit und Reproduzierbarkeit auf die Mykotoxine AFB₁, Zearalenon, T-2 Toxin, DAS und Roridin A zu untersuchen. Da viele andere Mykotoxine ein ähnliches Lösungsverhalten aufweisen (NOWOTNY et al., 1983a), sind weitere Anwendungsmöglichkeiten gegeben.

Eine Absicherung dieser enzymimmunologisch ermittelten Befunde durch physikalisch-chemische Referenzverfahren ist aber zumindest für gerichtliche und amtliche Zwecke trotzdem unerlässlich.

4.1.2 Ochratoxin A in Zerealien und Schweinenieren

Die für den enzymimmunologischen Nachweis von Ochratoxin A in Zerealien entwickelte Extraktion beruht auf der pH-abhängigen Löslichkeit dieses Toxins in wässrigen Lösungen und in organischen Lösungsmitteln, wie z.B. Dichlormethan bzw. Chloroform. Das Ansäuern von Proben pflanzlichen Ursprungs ist im Gegensatz zu den Proben tierischen Ursprungs zwar nicht nötig, wurde aber trotzdem durchgeführt, um die Löslichkeit des Ochratoxin A in Dichlormethan zu steigern. Das Ausschütteln dieses Rohextraktes mit NaHCO_3 -Lösung ist für Gerste und Weizen als schnelle und einfache Aufreinigung ausreichend. Die Nachweisgrenze lag bei 1 $\mu\text{g/kg}$. Eine ähnlich einfache Methode wurde inzwischen auch von CANDLISH et al. (1988) beschrieben; bei ihm lag aber aufgrund der geringeren Empfindlichkeit des Enzymimmunoassays die Nachweisgrenze bei 5 $\mu\text{g/kg}$ Gerste. In anderen Arbeiten wurde eine umfassendere Probenaufbereitung beschrieben. LEE und CHU (1984) verwendeten eine Sep-pak C_{18} Kartusche. MORGAN et al. (1983) steigerten durch einen zusätzlichen Konzentrierungsschritt die Nachweisgrenze auf 0,06 $\mu\text{g/kg}$.

Schwierigkeiten, d.h. unspezifische Beeinflussungen des Testsystems traten hingegen bei der Untersuchung von Hafer und Mischfuttermitteln auf, wobei sich allerdings die Interferenzen bei Hafer, wie sich beim Vergleich mit dem HPLC-Testsystem zeigte, nicht gravierend auswirkten. Es wurden keine weiteren Versuche unternommen, um insbesondere für die Mischfuttermittel die Extraktionsmethode weiter zu optimieren; vorstellbar in dieser Richtung wäre, wie bei der Niere durchgeführt, eine Aufreinigung des Rohextraktes über eine mit Oxalsäure vorbeschichtete Silica-Kartusche mit anschließender Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie. Andere Arbeiten über den enzymimmunologischen Nachweis von Ochratoxin A in Hafer und Mischfuttermittel liegen bislang nicht vor.

Das Vorkommen von Ochratoxin A in Feigen (BAUMANN und ZIMMERLI, 1988) und Kaffee (TSUBOUCHI et al., 1988) wurde beschrieben. In orientierenden Versuchen zeigte sich, daß die entwickelte Extraktionsmethode auch bei der Untersuchung von Feigen zufriedenstellende Ergebnisse aufweist, während für die Untersuchung von Kaffee eine säulenchromatographische Aufreinigung, wie sie für den Clean-up von Nierenrohextrakten angewandt wurde, nötig ist.

Bei der Methodikentwicklung zum enzymimmunologischen Nachweis von Ochratoxin A in der Niere lag das Hauptaugenmerk auf einer niedrigen Nachweisgrenze. Da aber dazu konzentrierte Extrakte in den ELISA eingesetzt werden müssen, konnte eine intensivere Probenaufbereitung nicht umgangen werden. Die angewandte säulenchromatographische Aufreinigung mittels einer mit Oxalsäure vorbeschichteten Silicia-Kartusche bedingt eine im Vergleich zu anderen säulenchromatographischen Aufreinigungen beträchtliche Lösungsmittelsparnis, da unter den gewählten Bedingungen nur die störenden Probenbestandteile, jedoch nicht das Ochratoxin A, an die Säulenmatrix adsorbiert werden. Dadurch kann auf die sonst übliche stufenweise Elution verzichtet werden. Die im Vergleich zu anderen säulenchromatographischen Clean-up's (KROGH et al., 1974; BAUER et al., 1984) um etwa 10% geringeren Wiederfindungsraten sind aber nicht auf die Aufreinigung, sondern auf den Extraktionsschritt zurückzuführen. Höhere Wiederfindungsraten ließen sich vielleicht durch eine intensivere Durchmischung der bei diesem Schritt entstehenden Emulsion z.B. mit einem Labor-mixer oder Stomacher erreichen, wodurch auch die Extraktionsdauer verkürzbar wäre. Daß die Bestimmung der Wiederfindungsraten in künstlich kontaminierten Proben nicht unbedingt den Gegebenheiten bei natürlicher Kontamination entspricht, ist jedoch auch in diesem Zusammenhang zu berücksichtigen. So fanden SCHEUER et al. (1984) nach einem enzymatischen Aufschluß einer natürlich kontaminierten Niere beträchtlich höhere Ochratoxin A Gehalte als mit einer Extraktion, die nur auf dem Ansäuern der Probenmatrix beruhte.

Die Nachweisgrenze des enzymimmunologischen Verfahrens liegt bei 0,1 µg/kg, ein Bereich der nur von den empfindlichsten physika-

lisch-chemischen Verfahren (BAUER et al., 1984) erreicht wird; das von MORGAN et al. (1986) vorgestellte Verfahren zum enzym-immunologischen Nachweis von Ochratoxin A in der Schweineniere, bei dem die Probenaufreinigung nur über eine Flüssig-Flüssig Verteilungschromatographie erfolgt, weist eine Nachweisgrenze von 0,5 - 1,0 µg/kg auf. Für die Untersuchung größerer Probenmengen z.B. bei der Überwachung von gesetzlich festgelegten Grenzwerten wären solche schnelleren Methoden eventuell einzusetzen.

Kreuzreaktionen der verwendeten Anti-Ochratoxin-A-Seren mit anderen Ochratoxinen wurden bislang nicht überprüft; so könnten bei der Untersuchung von Zerealien das Ochratoxin B (KROGH, 1977a), und bei den Lebensmitteln tierischer Herkunft Ochratoxin α als kreuzreagierende Substanzen auftreten. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Spezifität von anderen Anti-Ochratoxin-A-Seren kann jedoch davon ausgegangen werden, daß das verwendete Antiserum keine relevanten Kreuzreaktionen mit diesen beiden Ochratoxinen aufweist (MÄRTLBAUER, 1988).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Extraktions- und Aufbereitungsmethoden für Ochratoxin A stellen eine Anzahl von aufeinander aufbauenden Möglichkeiten dar, dieses Toxin entsprechend der "Schwierigkeit" des Probenmaterials sowie in Abhängigkeit von der gewünschten Sensivität zuverlässig mittels ELISA nachzuweisen. Der Nachweis von anderen "sauren" Mykotoxinen, d.h. Toxinen mit einer Carboxylgruppe, stellt eine weitere eventuelle Anwendungsmöglichkeit dieses Verfahrens dar.

4.1.3 Aflatoxin M_1 im Käse

Auch beim Nachweis von AFM_1 in Käse wurde im Hinblick auf eine eventuelle gesetzliche Höchstmenngenregelung großer Wert auf eine niedrige Nachweisgrenze gelegt. Dazu wurde der mit Dichlormethan gewonnene Rohextrakt eingeeengt. Durch eine selbstentwickelte Apparatur (Abb. 9), die es ermöglicht gleichzeitig 10-20 Proben einzuengen, gelang es das zeitaufwendige, sequentielle Einengen an einem Rotationsverdampfer zu umgehen. Die Entfettung des in Methanol/PBS (50:50) aufgenommenen Rückstandes erwies sich als

einfache, schnelle und ausreichende Aufreinigungsmethode. FREMY und CHU (1984) verwendeten hingegen zum enzymimmunologischen Nachweis von AFM₁ in Milchprodukten eine säulenchromatographische Aufreinigungsprozedur mittels einer Silicia-Kartusche; ein solches zeitaufwendiges Clean-up schränkt aber bei Verwendung eines enzymimmunologischen Nachweisverfahrens die pro Tag zu untersuchende Probenanzahl erheblich ein.

Die entwickelte Methode erlaubt bei geringem Lösungsmittelverbrauch die Extraktion und die enzymimmunologische Untersuchung von 30 Proben/Tag, weist also ein um etwa fünffach höheres Probendurchsatzpotential auf als übliche physikalisch-chemische Verfahren. Die Nachweisgrenze beträgt 15 ng/kg. Ähnliche Nachweisgrenzen sind bislang nur von einigen HPLC-Verfahren beschrieben (HISADA et al., 1984; BIJL et al., 1987).

4.2 Verifizierung der enzymimmunologisch gewonnenen Ergebnisse für Zearalenon und Ochratoxin A in Zerealien mittels HPLC

Neben Neutralisationstests gehören physikalisch-chemische Validierungsverfahren zum unverzichtbaren Instrumentarium bei der Entwicklung von Extraktionsverfahren für die Untersuchung mittels ELISA. Während erstere zum Ausschluß einer unspezifischen Beeinflußung des Testsystems und der Präsenz enzymhemmender Substanzen dienen, werden letztere zur Ergebnisverifizierung, aber auch zum Nachweis von möglicherweise vorhandenen, unbekannten kreuzreagierenden Substanzen benötigt. Solche Substanzen können Probeninhaltsstoffe oder andere Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen sein. So traten positive Ergebnisse bei der enzymimmunologischen Untersuchung von Kaffee bei RAUCH et al. (1988) auf. Verantwortlich waren die Kaffeeinhaltsstoffe 3,4-Dihydroxyzimtsäure (Kaffeensäure) und Chlorogensäure, die mit dem verwendeten Anti-AFB₁-Serum kreuzreagierten.

In den eigenen Untersuchungen wurde eine Verifizierung für Zearalenon und Ochratoxin A in Zerealien angestrebt, da die entsprechenden Antiseren hochspezifisch sind und deswegen, im

Gegensatz zu den Antiseren gegen Trichothecene, Kreuzreaktionen mit bekannten und in Zerealien vorkommenden Substanzen keine Rolle spielen.

Während für Zearalenon auf eine vorhandene HPLC-Methode zurückgegriffen werden konnte, mußte eine solche Nachweismethode für Ochratoxin A entwickelt werden. Aufgrund des in der Literatur beschriebenen gemeinsamen Vorkommens von Citrinin wurde auch dieses Toxin in die Untersuchungen miteinbezogen.

4.2.1 Nachweis von Ochratoxin A und Citrinin mittels HPLC

Die erstmals zum Clean-up von Zerealien verwendete mit Oxalsäure imprägnierte Silicia Sep-pak Kartusche weist gegenüber anderen säulenchromatographischen Aufreinigungsmethoden für den Nachweis von Ochratoxin A (COHEN und LAPOINTE, 1986; BAUER und GAREIS, 1987) den Vorteil auf, daß die Eluate keiner weiteren Aufreinigung wie einer Flüssig-Flüssig-Verteilung unterzogen werden müssen. Nach LEPOM (1986) besteht zudem noch die Möglichkeit, daß Citrinin mit NaHCO_3 -Lösungen unlösliche Komplexe bildet und so nicht mehr mit Chloroform rückextrahiert werden kann. Neben der Verkürzung der Extraktionsdauer durch die entwickelte Methode ist mit der Verwendung der oxalsäureimprägnierten Silicia-Kartusche auch eine Einsparung an Lösungsmitteln verbunden. Für den Nachweis von Citrinin in Mischfuttermittel scheint jedoch ein weiteres Clean-up erforderlich.

Die Wiederfindungsraten für Ochratoxin A liegen sehr hoch (96,4%). Für Citrinin dürften sich die Wiederfindungsraten nach Angaben von GIMENO (1984) durch die Zugabe von Glycolsäure um etwa 20% steigern lassen. Da aber der Nachweis von Citrinin im Rahmen der eigenen Untersuchungen nur von untergeordnetem Interesse war, wurden keine weiteren Versuche zur Optimierung der Methode unternommen.

Infolge der sequentiellen Elution von Ochratoxin A und Citrinin erhöht sich zwar die Analysendauer; aufgrund der Automatisierbar-

keit der HPLC fällt dies jedoch kaum ins Gewicht.

Die Nachweisgrenzen der Methodik (1,2 µg/kg für Ochratoxin A und 4,5 µg/kg für Citrinin) liegen deutlich besser als die von LEPOM (1986) (40 µg/kg bzw. 10 µg/kg), der bisher als einziger den gleichzeitigen Nachweis von Ochratoxin A und Citrinin in Gerste und Weizen mittels HPLC beschrieben hat. Für das von LEPOM (1986) angewandte HPLC-System wird zudem noch als Zusatzausrüstung ein Säulenofen benötigt. Die von BAUMANN und ZIMMERLI (1988) und DICK et al. (1988) beschriebenen HPLC-Systeme überzeugen zwar durch die sehr guten Nachweisgrenzen (0,1 µg/kg), allerdings erscheint es aufgrund der hohen Kosten für solche Nachweissysteme ineffektiv, für den Nachweis der beiden Toxine zwei HPLC-Anlagen zu verwenden.

Bei der Untersuchung von natürlich mit Ochratoxin A kontaminierten Zerealien zeigte sich, daß beide Toxine weitaus häufiger gemeinsam vorkommen, als es nach den Ergebnissen von KROGH et al. (1973) zu erwarten wäre. Die eigenen Untersuchungen bestätigten eher frühere Resultate von SCOTT et al. (1972). Aufgrund der synergistischen Wirkung beider Toxine auch hinsichtlich der Kanzerogenität (SHINOHARA et al., 1976; KANISAWA, 1984) verdient das simultane Vorkommen stärkere Beachtung.

Mit der entwickelten einfachen und schnellen Extraktions- und Nachweismethode ist es möglich, bei der häufiger durchgeführten Untersuchung auf Ochratoxin A ohne nennenswerte zusätzliche Arbeitsbelastung auch das Citrinin nachzuweisen.

4.2.2 Vergleich zwischen HPLC- und ELISA-Testsystemen

Sowohl für Zearalenon, als auch für Ochratoxin A ergab der Vergleich der enzymimmunologisch mit den physikalisch gewonnenen Ergebnissen eine sehr gute Korrelation beider Nachweissysteme trotz unterschiedlicher Extraktionsmethodik. Durch diese Korrelation werden zudem zum einen die angewandten Extraktionsmethoden bestätigt, und es wird zum anderen die Anwendbarkeit von enzymim-

munologischen Nachweisverfahren für die Mykotoxinbestimmung in Zerealien verdeutlicht.

4.3 Anwendbarkeit des ELISA zum Nachweis von nicht extrahierbarem Aflatoxin M_1 in Milch und Käse

Am Beispiel des AFM_1 sollte eine weitere Anwendungsmöglichkeit der ELISA-Testverfahren veranschaulicht werden. Neben der schnellen, einfachen und kostengünstigen Untersuchung von Lebens- und Futtermittel gestatten es diese Verfahren "gebundene", d.h. mit üblichen Methoden nicht extrahierbare und somit auch nicht nachweisbare Mykotoxinanteile zu bestimmen.

Das mögliche Vorliegen einer "gebundenen" AFM_1 -Fraktion in der Milch wurde aufgrund der Anreicherung im Käsebruch vermutet. Interessante Aspekte ergaben sich zusätzlich dadurch, daß das Phänomen der Zunahme des AFM_1 -Gehaltes des Käses während Reifung und Lagerung nur bei Verwendung einer natürlich kontaminierten Milch beobachtet werden konnte.

Bei der Interpretation der vorliegenden Literatur und dem Vergleich mit den eigenen Untersuchungen muß daher streng zwischen den Gegebenheiten bei einer natürlich und einer künstlich kontaminierten Milch unterschieden werden.

Die Entfettung der Milch hatte wie bei BLANC et al. (1983) nur sehr geringe Einflüsse auf den AFM_1 -Gehalt der Milch, so daß alle weiteren Untersuchungen aufgrund der besseren Handhabung mit einer entfetteten Milch durchgeführt wurden. Wie sich bei der Untersuchung einer natürlich kontaminierten Milch zeigte, ist es möglich, den nicht extrahierbaren Anteil des AFM_1 in der unbehandelten Milch mittels ELISA nachzuweisen. Er beträgt etwa ein Drittel der Gesamt- AFM_1 -Menge. Die anderen zwei Drittel sind mit Dichlormethan extrahierbar. Dieser Wert liegt somit zwischen den Angaben von GOTO und HSIEH (1985) und HELFERICH et al. (1986), die nach oraler Verabreichung von radioaktiv markiertem AFB_1 die AFM_1 -Verteilung in der Ziegenmilch untersuchten. Auch nach den

Angaben von BRACKETT und MARTH (1982c), die nach der Behandlung einer natürlich kontaminierten Milch mit einem eiweißabbauenden Enzym 30,7% mehr AFM_1 nachweisen konnten als in der unbehandelten Milch, weisen auf eine ähnliche Größenordnung des nicht extrahierbaren Anteils hin. Diese Freisetzung des nicht extrahierbaren Anteils konnte in den eigenen Untersuchungen jedoch nicht nachvollzogen werden; ein möglicher Grund hierfür könnte die etwas unterschiedliche Extraktion sein. Auch die Zunahme des AFM_1 -Gehaltes um 30 % einer natürlich kontaminierten Milch während einer Lagerung bei $-18^{\circ}C$, wie sie von STOLOFF et al. (1975) berichtet wurde, weist auf eine ähnliche Größenordnung des bei der Ausgangsmilch nicht extrahierbaren Anteils hin. Eine interessante Übereinstimmung mit den eigenen Untersuchungen weist die von APPLEBAUM und MARTH (1982) berichtete Wiederfindung von über 150% nach der Bilanzierung eines Hüttenkäse-Herstellungsveruchs auf. Umgerechnet bedeuten diese Ergebnisse, daß etwa 66% des AFM_1 -Gehaltes der Ausgangsmilch extrahierbar waren.

Die säulenchromatographische Aufreinigung stellt eine im Vergleich zum Ausschütteln mit Dichlormethan schonendere Extraktion dar, da es zu keinem Auftreten von Emulsionen kommt; dies dürfte die höheren AFM_1 -Werte beim Sep-pak Clean-up erklären.

Da sowohl bei der unbehandelten als auch bei der mit Protease behandelten Milch weder nach der Extraktion mit Dichlormethan noch nach der Sep-pak Aufbereitung der Milch mehr als nur geringe Spuren von AFM_1 in den wäßrigen Phasen gefunden wurde, ist darauf zu schließen, daß der nicht extrahierbare Anteil auch keine ausgeprägte Wasserlöslichkeit aufweist. Vielmehr ist davon auszugehen, daß infolge der Veränderung der Probenmatrix durch die jeweiligen Clean-up Manipulationen dieser AFM_1 -Anteil durch Einschlüsse in Probenbestandteile nicht mehr nachweisbar ist.

In der Literatur wird auf eine Affinität des AFM_1 sowohl zum Casein (BRACKETT und MARTH, 1982c) als auch zu den Molkenproteinen (KIERMEIER und BUCHNER, 1977b) hingewiesen. Aufgrund des unterschiedlichen Verhaltens des nicht extrahierbaren Anteils bei der Säurefällung bzw. der Labfällung muß jedoch noch von einer

zusätzlichen Affinität zu den Caseinmicellen ausgegangen werden.

Das Casein liegt in der Milch in Form von komplexen Partikeln oder Micellen vor, die außer den Casein-Eiweißstoffen Calcium, anorganisches Phosphat, Magnesium und Citrat enthalten. Säurezusatz zur Milch bewirkt einen fortschreitenden Entzug von Calcium und Phosphorsäure aus diesen Micellen, es kommt also zu einem Zerfall der Micellen. Am isoelektrischen Punkt bei pH 4,6 - 4,7 ist das Casein weitgehend von gebundenen Salzen frei. Bei der Labfällung dagegen kommt es zu einer Vernetzung der Caseinmicellen (JENNESS und PATTON, 1967). Der nicht extrahierbare AFM₁-Anteil verhielt sich bei diesen unterschiedlichen Fällungsmethoden folgendermaßen: nach der Säurefällung des Caseins und einmaligem Waschen des Niederschlags befand sich der gesamte nicht extrahierbare AFM₁-Anteil in der Sauermolke bzw. dem wäßrigen Überstand. Bei der Labfällung hingegen reicherte sich der gesamte Anteil im Käsebruch an. Das Verhalten des nicht extrahierbaren Anteils scheint also davon abhängig zu sein, inwieweit die Struktur der Caseinmicellen bei der jeweiligen milchtechnologischen Verarbeitung verändert wird oder nicht. Einen weiteren Hinweis in dieser Richtung ergibt sich dadurch, daß bei einer kühlgelagerten Milch der nicht extrahierbare Anteil auch beim Direkteinsatz nicht nachweisbar war; bei 5 °C wandert aber das β -Casein aus den Micellen aus, es kommt also zu einer Änderung der Micellenstruktur.

Durch die Proteasebehandlung des Käsebruches gelang es diesen nicht extrahierbaren Anteil freizusetzen; er war aber nicht dichlormethanolöslich. Da jedoch diese Ergebnisse nur auf einem Doppelansatz beruhen, der nach einer Lagerung der Käseproben bei -18 °C nicht wiederholt werden konnte, sind weitere Untersuchungen mit genügender statistischer Aussagekraft nötig. Erwähnenswert sind in diesem Zusammenhang auch Hinweise von BIJL et al. (1987), daß AFM₁ in einem künstlich kontaminierten Käse nach Inkubation mit einem eiweißabbauenden Enzym nicht mehr extrahierbar war.

Neben dem nicht extrahierbaren Anteil gibt es die vielfach in der

Literatur beschriebene AFM_1 -Fraktion, die sowohl in künstlich als auch in natürlich kontaminierter Milch eine Affinität zum Casein aufweist. Waschen mit A.dest. setzt diesen Anteil aus seiner "Bindung" zum Casein frei. Bei den Untersuchungen von BLANC et al. (1983) in künstlich kontaminierter Milch wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. Auch Berichte, daß AFM_1 zu einem gewissen Prozentsatz aus dem Käsebruch mit dem Waschwasser entfernt werden kann (KIERMEIER und BUCHNER, 1977a), bestätigen die eigenen Untersuchungen. Im Gegensatz zu der vorliegenden Literatur, in der die Affinität des AFM_1 zum Casein dafür verantwortlich gemacht wurde, daß Anteile des AFM_1 nicht extrahierbar sind (KIERMEIER und BUCHNER, 1977b; APPLEBAUM und MARTH, 1982; BRACKETT und MARTH, 1982c) weisen die eigenen Untersuchungen darauf hin, daß dieser AFM_1 -Anteil vollständig mit Dichlormethan zu lösen ist.

24 - 30% des Gesamt- AFM_1 befanden sich als dichlormethanolösliche Fraktion in der Sauermolke, 26 - 27,8% in der Käsemolke. Nach KIERMEIER und BUCHNER (1977b) ist anzunehmen, daß ein großer Teil davon eine Adsorption an die Molkenproteine zeigt.

Ein Vergleich der eigenen Untersuchungen mit der vorliegenden Literatur ist nur bei den Ergebnissen möglich, die durch Ausschütteln mit Dichlormethan erzielt wurden, bei denen also der nicht extrahierbare Anteil unberücksichtigt bleibt. Vergleichbare Untersuchungen mit einer natürlich kontaminierten Milch liegen nur von KIERMEIER und BUCHNER (1977a) vor. Nach Säurefällung fanden sie folgendes Verteilungsverhältnis: 48,5 - 59,4% des AFM_1 reicherten sich im Casein an, 38,5 - 43,4% befanden sich in der Sauermolke. In den eigenen Untersuchungen betrug das jeweilige Verhältnis 54,7 - 66% im Casein zu 34,0 - 45,3% in der Molke. Bei Herstellung eines Camembert fanden KIERMEIER und BUCHNER (1977a) 58,4% im Käsebruch und 40,5% in der Molke; in den eigenen Untersuchungen betrugen die Werte 57,9 - 61,0% und 39,0 - 42,1%. Deutliche Übereinstimmungen zwischen den beiden Untersuchungen sind vorhanden. Infolgedessen ergibt sich bei den Anreicherungs-faktoren ein ähnliches Bild: er betrug bei KIERMEIER und BUCHNER (1977b) 3,3; in den eigenen Untersuchungen variierte der Faktor von 3,2 bis 3,5. Bei Berücksichtigung des nicht extrahierbaren

Anteils erhöht sich aber dieser Faktor von 3,2 auf 3,8. Der Anstieg des AFM_1 -Gehaltes im Käse wurde in den eigenen Untersuchungen nach vier bis fünf Wochen Reifungs- bzw. Lagerzeit beobachtet, wobei gezeigt werden konnte, daß der Anstieg vom Reifungsverlauf abhängig ist. Diese Abhängigkeit wurde auch von BRACKETT et al. (1982) in einem Limburger Käse festgestellt. Wahrscheinlich bedingt durch unterschiedliche Reifungs- und Lagerbedingungen, konnten KIERMEIER und BUCHNER (1977b) schon nach zwei Wochen eine Zunahme des AFM_1 -Gehaltes im Käse feststellen.

Im Gegensatz zu diesen Autoren wurde in den eigenen Untersuchungen am Reifungsende eine AFM_1 -Abnahme (bezogen auf die Trockenmasse) von bis zu 45,9% festgestellt. FREMY et al. (1979) berichten ebenfalls von einem AFM_1 -Abbau während der Reifung und Lagerung eines Camembert, der allerdings mit künstlich kontaminierter Milch hergestellt worden war. Die Abnahme betrug abhängig von der Ausgangskonzentration der verwendeten Milch bis zu 75%.

Weitere Untersuchungen sind nötig, um abzuklären ob und auf welche Art und Weise AFM_1 während der Reifung und Lagerung von Camembert abgebaut wird, welche biologischen Eigenschaften diese Abbauprodukte aufweisen und wie sie nachweisbar sind. Weitere Untersuchungen sind auch nötig, um festzustellen auf welche Art und Weise sich das AFM_1 an das Casein bindet bzw. wie das AFM_1 in die Caseinmicellen eingelagert ist.

Es ist wenig bekannt, ob auch andere Mykotoxine in nicht extrahierbaren Verbindungen in Futter- und Lebensmittel vorliegen bzw. so verstoffwechselt werden, daß sie mit den üblichen physikalisch-chemischen Methoden nicht mehr erfaßt werden. Hinweise in dieser Richtung geben CHAKRABARTI und GHOSAL (1986), die von einer Veresterung des Zearalenon und T-2 Toxin mit Fettsäuren berichten, und KAMIMURA (1986), der eine Zearalenon-Glucosid Bildung nachweisen konnte. Abhängig von der jeweiligen Strukturänderung könnte der Nachweis solcher Verbindungen eine zusätzliche Anwendungsmöglichkeit für die Mykotoxin-Elisa's darstellen.

4.4 Vorkommen von Mykotoxinen in Zerealien und zerealienhaltigen Lebensmitteln

1987 kam es in Bayern aufgrund widriger Witterungsverhältnisse zu einem starken Pilzbefall der Getreidefelder, insbesondere mit *Fusarium culmorum*. Dies schlug sich in der Häufigkeit der mit Zearalenon belasteten Proben nieder. So waren 1987 66,7% der Winterweizenproben aus der besonderen Ernteerhebung mit Zearalenon kontaminiert, 1988 - einem Jahr mit weit günstigeren Witterungsverhältnissen - dagegen nur 4%. Während aber die unter statistischen Kautelen gezogenen Weizenproben nur gering belastet waren (Maximalwert 44,2 µg/kg), wiesen die Verdachtsproben eine weit höhere Belastung auf (Maximalwert 1560,8 µg/kg). 16,1% dieser Winterweizen- und 10,9% der Wintergersteproben enthielten mehr als 250 µg/kg, eine Konzentration, die nach BAUER et al. (1987) ausreicht, bei weiblichen Läuferschweinen deutliche Veränderungen am Genitaltrakt im Sinne eines Hyperöstrogenismus hervorzurufen.

Unabhängig von den unterschiedlichen Witterungsverhältnissen war jedoch der Hafer aus der besonderen Ernteerhebung in beiden Jahren mit T-2 bzw. HT-2 Toxin in einem hohem Umfang kontaminiert. Auch GAREIS et al. (1985) beobachteten, daß der Hafer häufiger mit *Trichothecenen* kontaminiert ist als andere Zerealien. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, daß diese Getreideart durch bestimmte Insekten oder -larven vorgeschädigt wird und dadurch für einen Fusarienbefall anfälliger ist. Ähnliche Überlegungen wurden für die AFB₁-Bildung auf vorgeschädigten Maiskörnern angestellt (SPICHER, 1981).

Der Nachweis einer geringgradigen AFB₁-Kontamination von Winterweizenproben aus dem Schweinfurter und Würzburger Raum steht zwar in Übereinstimmung zu Ergebnissen von BACHNER (1989), die in dieser Region ein im Vergleich zu anderen bayerischen Gebieten häufigeres Auftreten von AFM₁ in Bestandsmilchproben nachweisen konnte. Da aber eine AFB₁-Kontamination von einheimischem Getreide als ungewöhnlich gilt (SPICHER, 1981), bedürfen diese Ergebnisse einer Verifizierung mit physikalisch-chemischen Methoden bevor eine entsprechende Bewertung vorgenommen werden kann.

Ochratoxin A konnte in den Proben ab Feld nicht nachgewiesen werden. Eine auffällige Häufung von Ochratoxin A positiven Proben trat hingegen im Frühjahr, also nach sechs bis zehn Monaten Lagerzeit auf. Ähnliche Beobachtungen machten auch SZEBIOTKO et al. (1981) bei der Untersuchung von unterschiedlich lang gelagertem Getreide. Im übrigen wiesen die Lagerproben aus den Problemetrieben eine ähnliche hohe Toxinbelastung auf wie die Verdachtsproben ab Feld. Die Häufigkeit des Nachweises und Höhe der Kontamination lassen vermuten, daß Mykotoxine an multifaktoriell bedingten Krankheiten von landwirtschaftlichen Nutztieren beteiligt sein könnten.

Die untersuchten Mehlproben und zerealienhaltigen Lebensmittel waren nur in geringem Umfang mit Mykotoxinen belastet. Die Ergebnisse bei der Untersuchung der Verdachtsproben jedoch weisen auf eine potentielle Gefährdung der menschlichen Gesundheit hin, zumal diese Proben neben Zearalenon auch Deoxynivalenol in einem hohen Anteil und in hohen Konzentrationen enthielten (LEPSCHY-V.GLEISSENTHAL et al., 1989).

Anhand der Untersuchungsergebnisse wird deutlich, daß es bei ungünstigen Witterungsverhältnissen zu einer sowohl aus veterinärmedizinischer als auch aus lebensmittelhygienischer Sicht bedenklichen Mykotoxinbelastung des Getreides schon auf dem Feld kommen kann. Daher sind Überlegungen angebracht, ob nicht zur Gewährleistung des Verbraucherschutzes Zerealien, die für den menschlichen Verzehr bestimmt sind, zumindest in solchen "Mykotoxinjahren" wie z.B. 1987 vor ihrer Weiterverarbeitung einer Untersuchung unterzogen werden sollten.

Prinzipiell stellen immunchemische Methoden eine einfache und kostengünstige Alternative zu den physikalisch-chemischen Verfahren dar. Voraussetzung für die routinemäßige Anwendung enzym-immunologischer Nachweisverfahren zur Untersuchung von Lebensmitteln tierischen und pflanzlichen Ursprungs auf Mykotoxine sind jedoch Methoden zur Extraktion und Aufbereitung verschiedenster Probenmatrizes, wie sie in der vorliegenden Arbeit beschrieben werden. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit dieser Verfahren

stellt, wie am Beispiel des AFM₁ gezeigt werden konnte, der Nachweis von mit üblichen Methoden nicht extrahierbaren und somit nicht nachweisbaren Mykotoxinanteilen dar. Die Entwicklung von Papierstreifentests (SCHNEIDER et al., 1988) und Affinitätschromatographiesäulen (PESTKA, 1988), die zur Aufreinigung von schwierigen Probenmatrizes wie Bier, Kaffee, Käse, Schokolade oder kakaohaltige Produkte für den physikalisch-chemischen Nachweis eingesetzt werden könnten, eröffnen weitere interessante Aspekte für den Einsatz dieser Verfahren auf dem Gebiet der Analytik von Rückständen in Lebensmitteln pflanzlicher und tierischer Herkunft.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Anwendbarkeit enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Mykotoxinen in Lebensmitteln. Dazu wurden folgende Extraktions- und Aufbereitungsverfahren entwickelt:

1. Zum Nachweis von Aflatoxin B₁, Zearalenon, T-2 Toxin, Diacetoxyscirpenol und Roridin A in Zerealien wurden die Proben mit Methanol/A.dest. (70:30) versetzt und danach Aliquote des Filtrates mit Dichlormethan extrahiert. Nach Abdampfen des Dichlormethans wurde der Rückstand in Methanol/PBS/n-Heptan (1:1:1,5) aufgenommen. Der Methanolgehalt der wäßrigen Phase wurde auf 10% eingestellt und der Extrakt im ELISA eingesetzt. Die Nachweisgrenzen betrugen für Aflatoxin B₁ 1 ppb, für Zearalenon 2 ppb, für T-2 Toxin 2 ppb, für Diacetoxyscirpenol 1 ppb und für Roridin A 37,5 ppb. Die durchschnittlichen Wiederfindungsraten betrugen für Aflatoxin B₁ 56,6%, für Zearalenon 80,3%, für T-2 Toxin 93,5%, für Diacetoxyscirpenol 89,0% und für Roridin A 90,4%.
2. Zur Bestimmung von Ochratoxin A in Gerste und Weizen wurden die Proben nach Ansäuern mit Dichlormethan extrahiert und die Extrakte über Bicarbonat gereinigt. Die Nachweisgrenze der Methode lag bei 1 ppb, die Wiederfindungsraten betrugen 74,4% in Weizen und 92,8% in Gerste.
3. Zum Nachweis von Ochratoxin A in Schweinenieren wurden die Proben nach Ansäuerung mit Chloroform extrahiert und die Extrakte über eine mit Oxalsäure imprägnierte Silicia Sep-pak Kartusche gereinigt und anschließend mit Bicarbonat ausgeschüttelt. Die Nachweisgrenze betrug 0,1 ppb, die Wiederfindungsraten lagen bei 65,4%.
4. Zur Bestimmung von Aflatoxin M₁ in Käse wurden die Proben mit Dichlormethan extrahiert, das Lösungsmittel abgedampft und der Rückstand in Methanol/PBS/n-Heptan (0,5:0,5:1) aufgenommen. Der Methanolgehalt der wäßrigen Phase wurde auf 10% eingestellt und die Extrakte im ELISA eingesetzt. Die Nachweisgrenze lag bei 15 ppt, die Wiederfindungsrate in Camembert betrug 101,6%.

Für den gleichzeitigen Nachweis von Ochratoxin A und Citrinin mittels HPLC wurden die Proben mit Acetonitril/4% KCl extrahiert und der Extrakt über eine mit Oxalsäure imprägnierte Silicia Sep-pak Kartusche gereinigt. Die Nachweisgrenze der Methode lag für Ochratoxin A bei 1,2 ppb, für Citrinin bei 4,5 ppb. Die Wiederfindungsraten in Gerste betrugen für Ochratoxin A 96,4%, für Citrinin 62,2%.

Der Vergleich zwischen ELISA- und HPLC-Testsystemen für den Nachweis von Zearalenon und Ochratoxin A in Zerealien ergab eine gute Korrelation beider Methoden.

Zur Prüfung der Praktikabilität der entwickelten Methoden für die routinemäßige Untersuchung von Zerealien und zerealienhaltigen Lebensmittel mittels ELISA wurden in den Jahren 1987 und 1988 insgesamt 731 Proben untersucht:

1. Von 48 zufällig ausgewählten Winterweizenproben enthielten im Jahre 1987 32 Zearalenon; 1988 dagegen waren von 50 Proben nur zwei positiv; 44,2 bzw. 5,2 µg/kg waren die Maximalwerte in den Jahren 1987 bzw. 1988. Von 49 zufällig ausgewählten Haferproben des Jahres 1987 enthielten 29 T-2 Toxin; 1988 enthielten alle 30 untersuchten Proben T-2 Toxin; 118,7 bzw. 287,2 µg/kg waren die Maximalwerte in den Jahren 1987 bzw. 1988.
2. Von 190 Verdachtsproben des Jahres 1987 enthielten 143 Zearalenon; der Maximalwert betrug 1560,8 µg/kg.
3. Von 177 untersuchten Lagerproben enthielten 157 Zearalenon; der Maximalwert betrug 1518,8 µg/kg. 86 Proben enthielten T-2 Toxin; der Maximalwert betrug 385,1 µg/kg. 57 Proben enthielten Ochratoxin A; der Maximalwert betrug 2388,7 µg/kg.
4. Von 118 untersuchten Mehlproben enthielten 101 Zearalenon und 25 T-2 Toxin; der Maximalwert betrug für Zearalenon 48,3 µg/kg bzw. für T-2 Toxin 6,8 µg/kg.
5. Von 69 untersuchten zerealienhaltigen Lebensmitteln enthielten 33 Zearalenon und 9 T-2 Toxin; der Maximalwert betrug für Zearalenon 21,8 µg/kg bzw. für T-2 Toxin 8,7 µg/kg.

Von 21 Proben, die mit Ochratoxin A in einem Bereich von 1,5 - 1416,0 µg/kg kontaminiert waren, enthielten 18 Proben auch Citrinin in einem Bereich von 4,7 - 3445,8 µg/kg.

Mit dem enzymimmunologischen Verfahren zum Nachweis von Aflatoxin M₁ ist es möglich, das in einer natürlich kontaminierten Milch vorhandene "gebundene" Aflatoxin M₁ nachzuweisen, das etwa ein Drittel des Gesamt-Toxingehaltes darstellt. Bei der Labfällung des Caseins reichert sich dieser "gebundene" Anteil vollständig im Bruch an, während bei der Caseinfällung mittels Säure nur etwa ein Drittel dieses Anteils im Bruch zu finden ist.

S u m m a r y

Applicability of enzyme immunoassays for the detection of some mycotoxins (aflatoxin B₁, aflatoxin M₁, ochratoxin A, zearalenone, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, roridin A) in food of animal and plant origin

This paper concerns with the applicability of enzyme immunoassays for the detection of mycotoxins in food. For this purpose the following methods of extraction and clean-up were developed:

1. For the detection of aflatoxin B₁, zearalenone, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol and roridin A in cereals the samples were blended with methanol/a.dest. (70:30) and then aliquots of the filtrate were extracted with dichlormethane. After evaporation of the dichlormethane the residue was dissolved in methanol/PBS/n-heptan (1/1/1.5). The methanol concentration of the aqueous phase was adjusted to 10% and then the extract was assayed in the ELISA. The detection limits were 1 ppb for aflatoxin B₁, 2 ppb for zearalenone, 2 ppb for T-2 toxin, 1 ppb for diacetoxyscirpenol, and 37.5 ppb for roridin A, respectively. The average recovery rates were 56.6% for aflatoxin B₁, 80.3% for zearalenone, 93.5% for T-2 toxin, 89.0% for diacetoxyscirpenol, and 90.4% for roridin A, respectively.
2. For the determination of ochratoxin A in barley and wheat the samples were acidified, extracted with dichlormethane and the extracts were purified by using a bicarbonate clean-up step. The detection limit of the method was 1 ppb and the recovery rate was found to be 74.4% in wheat and 92.8% in barley, respectively.
3. For the detection of ochratoxin A in pig's kidneys the samples were acidified, extracted with chloroform and then the extracts were purified by using silica Sep-pak cartridge impregnated with oxalic acid and subsequently extracted with bicarbonate. The detection limit was 0.1 ppb and the recovery rates were found to be 65.4%.
4. For the determination of aflatoxin M₁ in cheese the samples

were extracted with dichlormethane, the solvent was evaporated and the residue was dissolved in methanol/PBS/n-heptan (0.5/0.5/1). The methanol concentration of the aqueous phase was adjusted to 10% and then the extracts were assayed in the ELISA. The detection limit was 15 ppt and the recovery rate was found to be 101.6% in Camembert cheese.

For the simultaneous detection of ochratoxin A and citrinin by HPLC the samples were extracted with acetonitrile/4% KCl and the extracts were purified by using a silicia Sep-pak cartridge impregnated with oxalic acid. The detection limit of the method was 1.2 ppb for ochratoxin A and 4.5 ppb for citrinin. The recovery rates in barley were found to be 96.4% for ochratoxin A and 62.2% for citrinin, respectively.

The comparison between ELISA and HPLC test systems showed good correlation of both methods for the detection of zearalenone and ochratoxin A in cereals.

To test the practicability of the developed methods for routine survey of cereals and grain-based food products by ELISA, in total 731 samples were analyzed in the year 1987 and 1988:

1. In the year 1987 32 samples of 48 randomly taken winter wheat samples contained zearalenone, in the year 1988 however only two of the samples were positive; 44.2 and 5.2 µg/kg were the highest values found in the year 1987 and 1988, respectively. In the year 1987 29 of 49 randomly taken oats samples contained T-2 toxin; in the year 1988 all of the 30 analyzed samples contained T-2 toxin; 118.7 and 287.2 µg/kg were the highest values found in the year 1987 and 1988, respectively.
2. 143 of 190 suspect samples in the year 1987 contained zearalenone; the maximum value was 1560.8 µg/kg.
3. 157 of 177 analyzed storage samples contained zearalenone; the maximum value was 1518,8 µg/kg. 86 samples contained T-2 toxin; the maximum value was 385.1 µg/kg. 57 samples contained ochratoxin A; the maximum value was 2388,7 µg/kg.

4. 101 of 118 analyzed flour samples contained zearalenone and 25 samples T-2 toxin; the maximum values were 48.3 µg/kg zearalenone and 6.8 µg/kg T-2 toxin, respectively.
5. 33 of 69 grain-based food products contained zearalenone and 9 of these samples T-2 toxin; the maximum values were 21.8 µg/kg zearalenone and 8.7 µg/kg T-2 toxin, respectively.

18 of 21 samples, which were contaminated with ochratoxin A in the range of 1.5 to 1416.0 µg/kg, also contained citrinin in the range of 4.7 to 3445.8 µg/kg.

With the enzyme immunoassay for the detection of aflatoxin M_1 it is possible to detect the "bound" aflatoxin M_1 , which is present in naturally contaminated milk at an amount of one third of the total toxin content. This "bound" aflatoxin M_1 enriches completely in the curd after precipitation of casein by using rennet, whereas only one third of the "bound" amount is found in the curd after precipitation of casein by using acid.

6 L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

ALLCROFT, R. und R. B. A. CARNAGHAN (1962):

Groundnut toxicity: *Aspergillus flavus* toxin (aflatoxin) in animal products: preliminary communication

Vet. Rec. 74, 863-864

APPLEBAUM, R. S. und E. H. MARTH (1982):

Fate of aflatoxin M₁ in cottage cheese

J. Food. Prot. 45, 903-904

APPLEBAUM, R. S., R. E. BRACKETT, D. W. WISEMAN und E. H. MARTH (1982):

Aflatoxin: toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and milk products - a review

J. Food Prot. 45, 752-777

BACHNER, U. (1989):

Zur Anwendung des enzymimmunologischen Nachweises von Aflatoxin M₁ bei Bestandmilchuntersuchungen in Bayern
Diss. med. vet. München

BALZER, I., C. BOGDANIC und S. PEPELJNJAK (1978):

Rapid thin layer chromatographic method for determining aflatoxin B₁, ochratoxin A, and zearalenone in corn

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 61, 584-585

BATA, A., A. VANYI und R. LASZTITY (1983):

Simultaneous detection of some fusariotoxins by gas-liquid chromatography

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 66, 577-581

BAUER, J. (1987):

Mykotoxine als Krankheitsursachen beim Schwein

Praktische Tierarzt, Collegium veterinarium XVIII, 120-124

BAUER, J. und M. GAREIS (1987):

Ochratoxin A in der Nahrungsmittelkette

J. Vet. Med. B 34, 613-627

BAUER, J., M. GAREIS und B. GEDEK (1984):

Zum Nachweis und Vorkommen von Ochratoxin A bei Schlachtschweinen

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 97, 279-283

BAUER, J., K. HEINRITZI, M. GAREIS und B. GEDEK (1987):

Veränderungen am Genitaltrakt des weiblichen Schweines nach
Verfütterung praxisrelevanter Zearalenonmengen

Tierärztl. Prax. 15, 33-36

BAUMANN, U. und B. ZIMMERLI (1988):

Einfache Ochratoxin-A-Bestimmung in Lebensmitteln

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 79, 151-158

BEAVER, R. W. (1986):

Gas chromatography in mycotoxin analysis

in: COLE, R. J. (Hrsg.): Modern methods in the analysis and
structural elucidation of mycotoxins, p. 293-333

Academic Press, Orlando

BETINA, V. (1984):

Zearalenone and brefeldin A

in: BETINA, V. (Hrsg.): Mycotoxins: Production, isolation,
separation and purification, p. 237-258

Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam

DERSELBE (1985):

Thin-layer chromatography of mycotoxins

J. Chromatogr. 334, 211-276

BIERMANN, A. und G. TERPLAN (1980):

Nachweis von Aflatoxin B₁ mittels ELISA

Arch. Lebensmittelhyg. 31, 51-57

DIESELBEN (1982):

Erfahrungen mit einem Mikro-ELISA zur Aflatoxin B₁-Bestimmung in Lebensmitteln

Arch. Lebensmittelhyg. 33, 17-20

BIJL, J. P., C. H. VAN PETEGHEM und D. A. DEKEYSER (1987):

Fluorimetric determination of aflatoxin M₁ in cheese

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70, 472-475

BLANC, B., E. LAUBER und R. SIEBER (1983):

Fixation de l'aflatoxine sur les protéines du lait

Microbiol. Alim. Nutr. 1, 163-177

BRACKETT, R. E. und E. H. MARTH (1982a):

Fate of aflatoxin M₁ in cheddar cheese and in process cheese spread

J. Food Prot. 45, 549-552

DIESELBEN (1982b):

Fate of aflatoxin M₁ in Parmesan and mozzarella cheese

J. Food Prot. 45, 5597-600

DIESELBEN (1982c):

Association of aflatoxin M₁ with casein

Z. Lebensm. Unters. Forsch. 174, 439-441

BRACKETT, R. E., R. S. APPLEBAUM, D. W. WISEMAN und

E. H. MARTH (1982):

Fate of aflatoxin M₁ in brick and limburger-like cheese

J. Food Prot. 45, 553-556

BÜCHMANN, N. B. und B. HALD (1985):

Analysis, occurrence and control of ochratoxin A residues in Danish pig kidneys

Food Addit. Contam. 3, 193-199

CANDLISH, A. A. G., W. H. STIMSON und J. E. SMITH (1988):
Determination of ochratoxin A by monoclonal antibody-based enzyme immunoassay

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71, 961-964

CANTON, J. H., R. KROES, M. J. VAN LOGTEN, M. VAN SCHOTHORST, J. F. C. STAVENUITER und C. A. H. VERHÜLSDONK (1975):

The carcinogenicity of aflatoxin M₁ in rainbow trout
Fd. Cosmet. Toxicol. 17, 159-166

CHAKRABARTI, D. K. und S. GHOSAL (1986):

Occurrence of free and conjugated 12,13-epoxytrichothecenes and zearalenone in banana fruits infected with *Fusarium moniliforme*
Appl. Environ. Microbiol. 51, 217-219

CHALAM, R. V. und H. M. STAHR (1979):

Thin layer chromatographic determination of citrinin
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62, 570-572

CHIBA, J., O. KAWAMURA, H. KAJII, K. OHTANI, S. NAGAYAMA und Y. UENO (1988):

A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of T-2 toxin with monoclonal antibodies
Food Addit. Contam. 5, 629-639

CHU, F. S. (1973):

A comparative study of the interaction of ochratoxins with bovine serum albumin
Biochem. Pharmacol. 23, 1105-1113

DERSELBE (1974):

Studies on ochratoxins
Critical Rev. Toxicol. 2, 499-524

CHU, F. S., T. S. L. FAN, G.-S. ZHANG und Y.-C. XU (1987):

Improved enzyme-linked immunosorbent assay for aflatoxin B₁ in agricultural commodities
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70, 854-857

CHU, F. S., R. C. LEE, M. W. TRUCKSESS und D. L. PARK (1988):
Evaluation by enzyme-linked immunosorbent assay of cleanup for
thin-layer chromatography of aflatoxin B₁ in corn, peanuts, and
peanut butter

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71, 953-956

COHEN, H. und M. LAPOINTE (1986):

Determination of ochratoxin A in animal feed and cereal grains by
liquid chromatography with fluorescence detection

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69, 957-959

CULLEN, J. M., B. H. RUEBNER, L. S. HSIEH, D. M. HYDE und
D. P. HSIEH (1987):

Carcinogenicity of dietary aflatoxin M₁ in male Fischer rats
compared to aflatoxin B₁

Cancer Res. 47, 1913-1917

DICK, R., U. BAUMANN und B. ZIMMERLI (1988):

Zum Vorkommen von Citrinin in Cerealien

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 79, 159-164

DUNN, B. B., M. E. STACK, D. L. PARK, A. JOSHI, L. FRIEDMAN und
R. L. KING (1983):

Isolation and identification of dihydrocitrinone, a urinary
metabolite of citrinin in rats

J. Tox. Environm. Health 12, 283-289

EL-NAKIB, O., J. J. PESTKA und F. S. CHU (1981):

Determination of aflatoxin B₁ in corn, wheat, and peanut butter
by enzyme-linked immunosorbent assay and solid phase
radioimmunoassay

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64, 1077-1082

ENDERS, C. (1984):

Zur Analytik von Zearalenon, α - und β -Zearalenol in Material
pflanzlichen und tierischen Ursprungs

Diss. med. vet. München

ENGEL, G. und H. HAGEMEISTER (1978):

Untersuchungen über den Verbleib von Aflatoxin B₁ im Verdauungs-
trakt von Kühen

Milchwissenschaft 33, 21-23

EPPLEY, R. M. (1966):

A versatile procedure for assay and preparatory separation of
aflatoxins from peanut products

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 49, 1218-1223

DERSELBE (1968):

Screening method for zearalenone, aflatoxin, and ochratoxin

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 51, 74-78

DERSELBE (1979):

Trichothecenes and their analysis

J. Am. Oil Chem. Soc. 56, 824-829

ESGIN, S. (1987):

Erstellung und Anwendung eines enzymimmunologischen Verfahrens
zum Nachweis von T-2 Toxin

Diss. med. vet. München

FAN, T. S. L., Y.-C. XU and F. S. CHU (1987):

Simultaneous analysis of T-2 toxin and HT-2 toxin by an indirect
enzyme-linked immunosorbent assay

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70, 657-661

FREMY, J. M. und F. S. CHU (1984):

Direct enzyme-linked immunosorbent assay for determining
aflatoxin M₁ at picogram levels in dairy products

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67, 1098-1101

FREMY, J.-M., J.-C. ROILAND und A. GAYMARD (1979):

Devenir de l'aflatoxine M₁ au cours de la fabrication du fromage
de type camembert

Ann. Nutr. Alim. 33, 619-630

FROHLICH, A. A., R. R. MARQUARDT und A. BERNATSKY (1988):
Quantification of ochratoxin A: use of reverse phase thin-layer
chromatography for sample cleanup followed by liquid
chromatography or direct fluorescence measurement
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71, 949-953

GALLATI, H. und I. PRACHT (1985):
Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung
der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H_2O_2 und
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 23, 453-460

GALTIER, P., M. ALVINERIE und J. L. CHARPENTEAU (1981):
The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and
chickens
Fd. Cosmet. Toxicol. 19, 735-738

GAREIS, M. (1982):
Untersuchungen zum gaschromatographischen Nachweis und zur
Bildung von Trichothecen
Diss. med. vet. München

GAREIS, M., J. BAUER und B. GEDEK (1985):
Fusarientoxine in Futtermitteln. Nachweis und Vorkommen von
Trichothecen
Tierärztl. Prax. Suppl. 1, 8-19

GAREIS, M., E. MÄRTLBAUER, J. BAUER und B. GEDEK (1988):
Bestimmung von Ochratoxin A in Muttermilch
Z. Lebensm. Unters. Forsch. 186, 114-117

GENDLOFF, E. H., J. J. PESTKA, S. P. SWANSON und
L. P. HART (1984):
Detection of T-2 toxin in Fusarium sporotrichioides-infected corn
by enzyme-linked immunosorbent assay
Appl. Environ. Microbiol. 47, 1161-1163

GIMENO, A. (1984):

Determination of citrinin in corn and barley on thin layer chromatographic plates impregnated with glycolic acid
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67, 194-196

GOLINSKI, P., J. CHELKOWSKI, A. KONARKOWSKI und
K. SZEBIOTKO (1983):

Mycotoxins in cereal grain. Part VI. The effect of ochratoxin A on growth and tissue residues of the mycotoxin in broiler chickens
Nahrung 27, 251-256

GOLINSKI, P., K. HULT, J. GRABARKIEWICZ-SZCZESNA, J. CHELKOWSKI, P. KNEBLEWSKI und K. SZEBIOTKO (1984):

Mycotoxic porcine nephropathy and spontaneous occurrence of ochratoxin A residues in kidneys and blood of Polish swine
Appl. Environ. Microbiol. 47, 1210-1212

GORST-ALLMAN, C. P. und P. S. STEYN (1979):

Screening methods for the detection of thirteen common mycotoxins
J. Chromatogr. 175, 325-331

GOTO, T. und D. P. H. HSIEH (1985):

Fractionation of radioactivity in the milk of goats administered ¹⁴C-aflatoxin B₁
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68, 456-458

GRANT, D. W. und F. W. CARLSON (1971):

Partitioning behavior of aflatoxin M₁ in dairy products
Bull. Environm. Contam. Toxicol. 6, 521-524

HACK, R. (1988):

Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen die Trichothecene T-2 Toxin und Roridin A und deren Anwendung bei experimentellen Intoxikationen
Diss. med. vet. München

HALD, B. und P. KROGH (1973):

Analysis and chemical confirmation of citrinin in barley
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 56, 1440-1443

HALD, B. und P. KROGH (1975):

Detection of ochratoxin A in barley, using silicia gel
minicolumns

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 58, 156-158

HANIKA, C., W. W. CARLTON, G. D. BOON und J. TUIITE (1984):
Citrinin mycotoxicosis in the rabbit: clinicopathological
alterations

Fd. Chem. Toxic. 12, 999-1008

HAUBECK, H.-D., G. LORKOWSKI, E. KÖLSCH und
R. RÖSCHENTHALER (1981):

Immunosuppression by ochratoxin A and its prevention by
phenylalanine

Appl. Environ. Microbiol. 41, 1040-1042

HEESCHEN, W., A. BLÜTHGEN und H. NIJHUIS (1986):

Entwicklungstendenzen in der rückstandshygienischen Situation der
Milch

Kieler milchwirtsch. Forschungsber. 38, 131-145

HELFERICH, W. G., R. L. BALDWIN und D. P. H. HSIEH (1986):

¹⁴C-aflatoxin B₁ metabolism in lactating goats and rats

J. Anim. Sci. 62, 697-705

HEUSEL, A. (1987):

Untersuchungen zur Vereinfachung des enzymimmunologischen Nach-
weises von Aflatoxin M₁ in Milch

Diss. med. vet. München

HISADA, K., H. TEREDA, K. YAMAMOTO, H. TSUBOUCHI und
Y. SAKABE (1984):

Reverse phase liquid chromatographic determination and
confirmation of aflatoxin M₁ in cheese

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67, 601-606

HOFMANN, G. (1983):

Vorkommen von Ochratoxin A in Blut und Nieren von Schweinen
Mitt. Bundesanstalt f. Fleischforsch., Kulmbach, Nr. 80,
5547-5551

HULT, K. und S. GATENBECK (1976):

A spectrophotometric procedure, using carboxypeptidase A, for the
quantitative measurement of ochratoxin A
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 59, 128-129

HULT, K., A. TEILING und S. GATENBECK (1976):

Degradation of ochratoxin A by a ruminant
Appl. Environ. Microbiol. 32, 443-444

HULT, K., R. PLESTINA, V. HABAZIN-NOVAK, B. RADIC und
S. CEOVIC (1982):

Ochratoxin A in human blood and Balkan endemic nephropathy
Arch. Toxicol. 51, 313-321

HUNT, D. C., L. A. PHILP und N. T. CROSBY (1979):

Determination of ochratoxin A in pig's kidney using enzymic
digestion, dialysis and high-performance liquid chromatography
with post-column derivatisation
Analyst 104, 1171-1175

IARC (International Agency for Research on Cancer) (1983):

IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of
chemicals to humans: some food additives, feed additives and
naturally occurring substances, Lyon, France, 31, 279-291

JENNESS, R. und S. PATTON (1967):

Grundzüge der Milchchemie
Bayerischer Landwirtschaftsverlag, München Basel Wien

JACKSON, L. K. und A. CIEGLER (1978):

Production and analysis of citrinin in corn
Appl. Environ. Microbiol. 36, 408-411

JOSEFSSON, E. und T. MÖLLER (1979):

High pressure liquid chromatographic determination of ochratoxin A and zearalenone in cereals

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62, 1165-1168

KAMIMURA, H. (1986):

Conversion of zearalenone to zearalenone glycoside by *Rhizopus* sp.

Appl. Environ. Microbiol. 52, 515-519

KAMIMURA, H., M. NISHIJIMA, K. YASUDA, K. SAITO, A. IBE, T.

NAGAYAMA, H. USHIYAMA und Y. NAOI (1981):

Simultaneous detection of several *Fusarium* mycotoxins in cereals, grains, and foodstuffs

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64, 1067-1073

KANISAWA, M. (1984):

Synergistic effect of citrinin on hepatorenal carcinogenesis of ochratoxin A in mice

in: KURATA, H. und Y. UENO (Hrsg.): Toxigenic fungi - their toxins and health hazard; Developments in food science 7, p. 245-254

Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam

KANISAWA, M. und S. SUZUKI (1978):

Induction of renal and hepatic tumors in mice by ochratoxin A, a mycotoxin

Gann 69, 599-600

KEMPAINEN, B. W., R. T. RILEY und S. BILES-THURLOW (1987):

Comparison of penetration and metabolism of (³H)diacetoxy-scirpenol, (³H)verrucarin A and (³H)T-2 toxin in skin

Fd. Chem. Toxic. 25, 379-386

KIERMEIER, F. (1985):

Das Mykotoxin-Problem: Ergebnisse der Lebensmittelüberwachung

Z. Lebensm. Unters. Forsch. 180, 389-393

KIERMEIER, F. und M. BUCHNER (1977a):

Zur Verteilung von Aflatoxin M_1 auf Molke und Bruch bei der Käseherstellung

Z. Lebensm. Unters. Forsch. 164, 82-86

DIESELBEN (1977b):

Verhalten von Aflatoxin M_1 während der Reifung und Lagerung von Käse

Z. Lebensm. Unters. Forsch. 164, 87-91

KIERMEIER, F. und R. MASHALEY (1977):

Einfluß der molkereitechnischen Behandlung der Rohmilch auf den Aflatoxin- M_1 -Gehalt der daraus hergestellten Produkte

Z. Lebensm. Unters. Forsch. 164, 183-187

KIERMEIER, F., G. WEISS, G. BEHRINGER und M. MILLER (1977):

Über das Vorkommen und den Gehalt von Aflatoxin M_1 in Käsen des Handels

Z. Lebensm. Unters. Forsch. 163, 268-271

KIERMEIER, F., M. MILLER, G. WEISS und G. BEHRINGER (1978):

Possibilities of interference in the identification of aflatoxin M_1

Z. Lebensm. Unters. Forsch. 166, 274-279

KIESSLING, K.-H., H. PETERSSON, K. SANDHOLM und M. OLSEN (1984):

Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria

Appl. Environ. Microbiol. 47, 1070-1073

KLAFFER, U. (1988):

Entwicklung und Anwendung eines enzymimmunologischen Nachweisverfahrens für Diacetoxyscirpenol

Diss. med. vet. München

KLAFFER, U., E. MÄRTLBAUER und G. TERPLAN (1987):

Development of a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of diacetoxyscirpenol

Int. J. Food Microbiol. 6, 9-17

KOBAYASHI, J., T. HORIKOSHI, J.-C. RYU, F. TASHIRO, K. ISHII und Y. UENO (1987):

The cytochrome P-450-dependent hydroxylation of T-2 toxin in various animal species

Fd. Chem. Toxic. 25, 539-544

KROGH, P. (1974):

Mycotoxic nephropathy

in: PURCHASE, I. F. H. (Hrsg.): Mycotoxins, p. 419-428

Elsevier Scientific Publishing, New York

DERSELBE (1977a):

Ochratoxins

in: RODRICKS, J. V., C. W. HESSELTINE und M. A. MEHLMAN (Hrsg.)

Mycotoxins in human and animal health; p. 489-499

Pathotox Publishers, Park Forest South

DERSELBE (1977b):

Ochratoxin A residues in tissues of slaughter pigs with nephropathy

Nord. Vet. Med. 29, 402-405

DERSELBE (1978):

Causal associations of mycotoxic nephropathy

Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. A, Suppl. 269, 1-28

KROGH, P., B. HALD und E. J. PEDERSEN (1973):

Occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals associated with mycotoxic porcine nephropathy

Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B. 81, 689-695

KROGH, P., B. HALD, R. PLESTINA und S. CEOVIC (1977):

Balkan (endemic) nephropathy and foodborn ochratoxin A:
preliminary results of a survey of foodstuffs

Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B 85, 238-240

KROGH, P., F. ELLING, B. HALD, A. E. LARSEN, E. B. LILLEHOJ, A.
MADSEN und H. P. MORTENSEN (1976):

Time-dependent disappearance of ochratoxin A residues in tissues
of bacon pigs

Toxicol. 6, 235-242

KROGH, P., N. H. AXELSEN, F. ELLING, N. GYRD-HANSEN, B. HALD, J.
HYLDGAARD-JENSEN, A. E. LARSEN, A. MADSEN, H. P. MORTENSEN,
T. MOLLER, O. K. PETERSEN, U. RAVNSKOV, M. ROSTGAARD und
O. AALUND (1974):

Experimental porcine nephropathy

Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. A, Suppl. 246, 1-21

KUIPER-GOODMAN, T., P. M. SCOTT und H. WATANABE (1987):

Risk assessment of the mycotoxin zearalenone

Reg. Toxicol. Pharmacol. 7, 253-306

LEE, S. C. und F. S. CHU (1984):

Enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin A in wheat

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67, 45-49

LEPSCHY-V.GLEISSENTHAL, J., R. DIETRICH, E. MÄRTLBAUER, M.
SCHUSTER, A. SÜSS und G. TERPLAN (1989):

A survey on the occurrence of Fusarium mycotoxins in Bavarian
cereals from the 1987 harvest

Z. Lebensm. Unters. Forsch., in Druck

LEPOM, P. (1986):

Simultaneous determination of the mycotoxins citrinin and
ochratoxin A in wheat and barley by high-performance liquid
chromatography

J. Chromatogr. 355, 335-339

LÜTHY, J. und H. WINDEMANN (1987):

Immunchemische Methoden in der Lebensmittelanalytik

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 78, 147-167

MADSEN, A., H. P. MORTENSEN und B. HALD (1982):

Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs. I. Influence on pig performance and residues

Acta Agric. Scand. 32, 225-239

MÄRTLBAUER, E. P. (1988):

Zur Entwicklung enzymimmunologischer Verfahren für den Nachweis von Mykotoxinen (Aflatoxine, Ochratoxin A und Trichothecene) in Lebensmitteln

Diss. med. vet. München

MÄRTLBAUER, E. und G. TERPLAN (1985):

Ein hochempfindlicher heterologer enzymimmunologischer Nachweis von Aflatoxin M₁ in Milch und Milchpulver

Arch. Lebensmittelhyg. 36, 53-55

DIESELBEN (1988):

Ein enzymimmunologisches Verfahren zum Nachweis von Ochratoxin A in Schweineseren

Arch. Lebensmittelhyg. 39, 143-147

MÄRTLBAUER, E., M. GAREIS und G. TERPLAN (1988):

Enzyme immunoassay for the macrocyclic trichothecene roridin A: production, properties, and use of rabbit antibodies

Appl. Environ. Microbiol. 54, 225-230

MARASAS, W. F. O., S. J. VAN RENSBURG und C. J. MIROCHA (1979):
Incidence of Fusarium species and the mycotoxins, deoxynivalenol and zearalenone, in corn produced in esophageal cancer areas in Transkei

J. Agric. Food Chem. 27, 1108-1112

MARTI, L. R., D. M. WILSON und B. D. EVANS (1978):

Determination of citrinin in corn and barley

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 61, 1353-1358

MAYURA, K., R. V. REDDY, A. W. HAYES und O. W. BERNDT (1982):
Embryocidal, fetotoxic and teratogenic effects of ochratoxin A
in rats

Toxicol. 25, 175-185

MC KINNEY, J. D., G. C. CAVANAGH, J. T. BELL, A. S. HOVERSLAND,
D. M. NELSON, J. PEARSON und R. J. SELKIRK (1973):

Effects of ammoniation on aflatoxins in rations fed lactating
cows

J. Am. Oil Chem. Soc. 50, 79-84

MEHDI, N. A. Q., W. W. CARLTON und J. TUIE (1981):

Citrinin mycotoxicosis in broiler chickens

Fd. Cosmet. Toxicol. 19, 723-733

MICCO, C., M. MIRAGLIA, R. ONORI, A. IOPPOLO und

A. MANTOVANI (1987):

Long-term administration of low doses of mycotoxins in poultry.

I. Residues of ochratoxin A in broilers and laying hens

Poultry Science 66, 47-50

MILLS, E. N. C., J. M. JOHNSTON, H. A. KEMP und M. R. A. MORGAN
(1988):

An enzyme-linked immunosorbent assay for diacetoxyscirpenol
applied to the analysis of wheat

J. Sci. Food Agric. 42, 225-233

MIROCHA, C. J., S. V. PATHRE und T. S. ROBISON (1981):

Comparative metabolism of zearalenone and transmission into
bovine milk

Fd. Cosmet. Toxicol. 19, 25-30

MORGAN, M. R. A., R. MCNERNEY und H. W.-S. CHAN (1983):

Enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin A in barley

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 66, 1481-1484

MORGAN, M. R. A., R. MCNERNEY, H. W.-S. CHAN und
P. H. ANDERSON (1986):
Ochratoxin A in pig kidney determined by enzyme-linked
immunosorbent assay (ELISA)
J. Sci. Food Agric. 37, 475-480

MORTIMER, D. N., J. GILBERT und M. J. SHEPHERD (1987a):
Rapid and highly sensitive analysis of aflatoxin M₁ in liquid and
powdered milks using an affinity column cleanup
J. Chromatogr. 407, 393-398

MORTIMER, D. N., M. J. SHEPHERD, J. GILBERT und
M. R. A. MORGAN (1987b):
A survey of the occurrence of aflatoxin B₁ in peanut butters by
enzyme-linked immunosorbent assay
Food Addit. Contam. 5, 127-132

MUNKSGAARD, L., J. LARSEN, H. WERNER, P. E. ANDERSEN
und B. T. VIUF (1987):
Carry over of aflatoxin from cows' feed to milk and milk products
Milchwissenschaft 42, 165-167

NESHEIM, S., N. F. HARDIN, O. J. FRANCIS JR und
W. S. LANGHAM (1973):
Analysis of ochratoxins A and B and their esters in barley, using
partition and thin layer chromatography.
I. Development of the method
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 56, 817-821

NOWOTNY, P., W. BALTES, W. KRÖNERT und R. WEBER (1983a):
Dünnschichtchromatographische Methode zur Bestimmung von 22
Mykotoxinen in verschimmelten Lebensmitteln
Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 8, 24-28

DIESELBEN (1983b):
Hochleistungsflüssigkeitschromatographische Bestimmung von
Ochratoxin A in Weizenkleie
Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 8, 29-31

OSBORNE, B. G. (1980):

The occurrence of ochratoxin A in mouldy bread and flour
Fd. Cosmet. Toxicol. 18, 615-617

PATHRE, S.V. und C. J. MIROCHA (1977):

Assay methods for trichothecenes and review of their natural
occurrence

in: RODRICKS, J. V., C. W. HESSELTINE und M. A. MEHLMANN (Hrsg.):
Mycotoxins in human and animal health, p. 229-253
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

PATTERSON, D. S. P. und B. A. ROBERTS (1979):

Mycotoxins in animal feedstuffs: sensitive thin layer
chromatographic detection of aflatoxin, ochratoxin A,
sterigmatocystin, zearalenone, and T-2 toxin
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62, 1265-1267

PESTKA, J. J. (1988):

Enhanced surveillance of foodborne mycotoxins by immunochemical
assay
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71, 1075-1081

PESTKA, J. J., S. C. LEE, H. P. LAU und F. S. CHU (1981):

Enzyme-linked immunosorbent assay for T-2 toxin
J. Am Oil Chem. Soc. 58, 940A-944A

PETKOVA-BOCHAROVA, T. und M. CASTEGNARO (1985):

Ochratoxin A contamination of cereals in an area of high
incidence of Balkan endemic nephropathy in Bulgaria
Food Addit. Contam. 2, 267-270

PETKOVA-BOCHAROVA, T., I. N. CHERNOZEMSKY und
M. CASTEGNARO (1988):

Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic
nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria
Food Addit. Contam. 5, 299-301

- PHILLIPS, R. D., A. W. HAYES und W. O. BERNDT (1980):
High-performance liquid chromatographic analysis of the mycotoxin
citrinin and its application to biological fluids
J. Chromatogr. 190, 419-427
- PIVA, G., A. PIETRI, L. GALAZZI und O. CURTO (1987):
Aflatoxin M₁ occurrence in dairy products marketed in Italy
Food Addit. Contam. 5, 133-139
- POLAN, C. E., J. R. HAYES und T. C. CAMPBELL (1974):
Consumption and fate of aflatoxin B₁ by lactating cows
J. Agric. Food Chem. 22, 635-638
- POLZHOFFER, K.-P. (1977a):
Aflatoxinbestimmung in Milch und Milchprodukten
Z. Lebensm. Unters. Forsch. 163, 175-177
- DERSELBE (1977b):
Hitzestabilität von Aflatoxin M₁
Z. Lebensm. Unters. Forsch. 164, 80-81
- PURCHASE, I. F. H., M. STEYN, R. RINSMA und R. C. TUSTIN (1972):
Reduction of aflatoxin M₁ content of milk by processing
Fd. Cosmet. Toxicol. 10, 383-387
- RAM, B. P., L. P. HART, O. L. SHOTWELL und J. J. PESTKA (1986):
Enzyme-linked immunosorbent assay of aflatoxin B₁ in naturally
contaminated corn and cottonseed
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69, 904-907
- RAUCH, P., L. FUKAL, P. BREZINA und J. KAS (1988):
Interferences in radioimmunoassay of aflatoxins in food and
fooder samples of plant origin
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71, 491-493
- REDDY, R. V., K. MAYURA, A. W. HAYES und W. O. BERNDT (1982a):
Embryocidal teratogenic and fetotoxic effects of citrinin in rats
Toxicol. 25, 151-160

REDDY, R. V., A. W. HAYES und W. O. BERNDT (1982b):
Disposition and metabolism of (¹⁴C)citrinin in pregnant rats
Toxicol. 25, 161-174

REISS, J. (1981):
Mykotoxine in Lebensmitteln
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York

RENZ, V. (1989):
Entwicklung und Anwendung eines enzymimmunologischen Nachweisver-
fahrens für Zearalenon
Diss. med. vet. München

ROBERTS, B. A., E. M. GLANCY und D. S. P. PATTERSON (1981):
Rapid, economical method for determination of aflatoxin and
ochratoxin A in animal feedstuffs
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64, 961-963

RODRICKS, J. V., C. W. HESSELTINE und M. A. MEHLMAN (1977):
Mycotoxins in human and animal health; p. 6-186
Pathotox Publishers, Park Forest South

ROMER, T. R. (1975):
Screening method for the detection of aflatoxins in mixed feeds
and other agricultural commodities with subsequent confirmation
and quantitative measurement of aflatoxins in positive samples
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 58, 500-506

ROMER, T. R., T. M. BOLING und J. L. MACDONALD (1978):
Gas-liquid chromatographic determination of T-2 toxin and
diacetoxyscirpenol in corn and mixed feeds
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 61, 801-808

ROOD, H. D., W. B. BUCK und S. P. SWANSON (1988):
Gas chromatographic screening method for T-2 toxin,
diacetoxyscirpenol, deoxynivalenol, and related
trichothecenes in feeds
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71, 493-498

ROUSSEAU, D. M. und C. H. VAN PETEGHEM (1989):

Spontaneous occurrence of ochratoxin A residues in porcine kidneys in Belgium

Bull. Environ. Contam. Toxicol. 42, 181-186

ROUSSEAU, D. M., G. A. SLEGGERS und C. H. VAN PETEGHEM (1985):

Radioimmunoassay of ochratoxin A in barley

Appl. Environ. Microbiol. 50, 529-531

ROUSSEAU, D. M., A. A. G. CANDLISH, G. A. SLEGGERS, C. H. VAN PETEGHEM, W. H. STIMSON und J. E. SMITH (1987):

Detection of ochratoxin A in porcine kidneys by a monoclonal antibody-based radioimmunoassay

Appl. Environ. Microbiol. 53, 514-518

RUTQVIST, L., N.-E. BJÖRKLUND, K. HULT und S. GATENBECK (1977):

Spontaneous occurrence of ochratoxin A residues in kidneys of fattening pigs

Zbl. Vet. Med. A 24, 402-408

RUTQVIST, L., N.-E. BJÖRKLUND, K. HULT, E. HÖKBY und B. CARLSSON (1978):

Ochratoxin A as the cause of spontaneous nephropathy in fattening pigs

Appl. Environ. Microbiol. 36, 920-925

SANSING, G. A., E. B. LILLEHOJ, R. W. DETROY und M. A. MILLER (1976):

Synergistic toxic effects of citrinin, ochratoxin A and penicillic acid in mice

Toxicon 14, 213-220

SCHEUER, R. und L. LEISTNER (1985):

Vorkommen von Ochratoxin A in Schlachtschweinen und Fleisch-erzeugnissen

Mitt. Bundesanstalt f. Fleischforsch., Kulmbach, Nr. 88, 6436-6439

SCHEUER, R., K. BERNARD und L. LEISTNER (1984):
Rückstände von Ochratoxin A in Schweineseren
Mitt. Bundesanstalt f. Fleischforsch., Kulmbach, Nr. 84,
5781-5784

SCHIEFER, H. B., C. G. ROUSSEAUX, D. S. HANCOCK und
B. R. BLAKLEY (1987):
Effects of low-level long-term oral exposure to T-2 toxin
in CD-1 mice
Fd. Chem. Toxic. 25, 593-601

SCHMIDT, R., E. ZIEGENHAGEN und K. DOSE (1981):
High-performance liquid chromatography of trichothecenes
I. Detection of T-2 toxin and HT-2 toxin
J. Chromatogr. 212, 370-373

SCHNEIDER, E., E. MÄRTLBAUER und G. TERPLAN (1988):
ELISA-Teststreifenverfahren zum Nachweis von Mykotoxinen und
pharmakologisch wirksamen Substanzen in der Milch
29. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der
Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft in
Garmisch-Partenkirchen, p.328-331

SCHUBRING, S. L. und F. S. CHU (1987):
An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection
of diacetoxyscirpenol in wheat and corn
Mycotoxin Research 3, 97-106

SCOTT, P. M., B. KENNEDY und W. VAN WALBEEK (1971):
Simplified procedure for the purification of ochratoxin A from
extracts of *Penicillium viridicatum*
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 54, 1445-1447

SCOTT, P. M., W. VAN WALBEEK, J. HARWIG und D. I. FENNELL (1970):
Occurrence of a mycotoxin, ochratoxin A, in wheat and isolation of
ochratoxin A and citrinin producing strains of *Penicillium*
viridicatum
Can. J. Plant Sci. 50, 583-585

SCOTT, P. M., W. VAN WALBEEK, B. KENNEDY und D. ANYETI (1972):
Mycotoxins (ochratoxin A, citrinin, and sterigmatocystin) and
toxigenic fungi in grains and other agricultural products
J. Agr. Food Chem. 20, 1103-1109

SHEPHERD, M. J. (1986):

High-performance liquid chromatography and its application to the
analysis of mycotoxins

in: COLE, R. J. (Hrsg.): Modern methods in the analysis and
structural elucidation of mycotoxins, p. 293-333

Academic Press, Orlando

SHINOHARA, Y., M. ARAI, K. HIRAO, S. SUGIHARA, K. NAKANISHI, H.
TSUNODA und N. ITO (1976):

Combination effect of citrinin and other chemicals on rat kidney
tumorigenesis

Gann 67, 147-153

SIEBER, R. und B. BLANC (1978):

Zur Ausscheidung von Aflatoxin M₁ in die Milch und dessen Vorkom-
men in Milch und Milchprodukten - eine Literaturübersicht

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 69, 477-491

SNYDER, A. P. (1986):

Qualitative, quantitative and technological aspects of the
trichothecene mycotoxins

J. Food Prot. 49, 544-569

SPICHER, G. (1981):

Schimmelpilze und Mykotoxine in Getreide

in: REISS, J. (Hrsg): Mykotoxine in Lebensmitteln, p. 343-380

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York

STOJKOVIC, R., K. HULT, S. GAMULIN und R. PLESTINA (1984):

High affinity binding of ochratoxin A to plasma constituents

Biochemistry Int. 9, 33-38

STOLOFF, L. (1977):

Aflatoxins-an overview

in: RODRICKS, J. V., C. W. HESSELTINE und M. A. MEHLMAN (Hrsg.):

Mycotoxins in human and animal health; p. 7-29

Pathotox Publishers, Park Forest South

DERSELBE (1980):

Aflatoxin M in perspective

J. Food Prot. 43, 226-230

STOLOFF, L., M. TRUCKSESS, N. HARDIN, O. J. FRANCIS, J. R. HAYES,
C. E. POLAN und T. C. CAMPBELL (1975):

Stability of aflatoxin M in milk

J. Dairy Sci. 58, 1789-1793

STUBBLEFIELD, R.D. (1979a):

Thin layer chromatographic determination of citrinin

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62, 201-202

DERSELBE (1979b):

The rapid determination of aflatoxin M₁ in dairy products

J. Am. Oil Chem. Soc. 56, 800-802

STUBBLEFIELD, R. D. und G. M. SHANNON (1974):

Aflatoxin M₁: analysis in dairy products and distribution in
dairy foods made from artificially contaminated milk

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 57, 847-851

SÜSS, A. (1988):

Persönliche Mitteilung

SWANSON, S. P., C. HELASZEK, W. B. BUCK, H. D. ROOD JR und W. M.
HASCHEK (1988):

The role of intestinal microflora in the metabolism of
trichothecene mycotoxins

Fd. Chem. Toxic. 26, 823-829

SYDENHAM, E. W. und P. G. THIEL (1987):

The simultaneous determination of diacetoxyscirpenol and T-2 toxin in fungal cultures and grain samples by capillary gas chromatography

Food Addit. Contam. 3, 277-284

SZEBIOTKO, K., J. CHELKOWSKI, G. DOPIERALA, B. GODLEWSKA und W. RADOMYSKA (1981):

Mycotoxins in cereal grain. Part I. Ochratoxin, citrinin, sterigmatocystin, penicillic acid and toxigenic fungi in cereal grain

Nahrung 25, 415-421

TAKEDA, Y., E. ISOHATA, R. AMANO und M. UCHIYAMA (1979):

Simultaneous extraction and fractionation and thin layer chromatographic determination of 14 mycotoxins in grains

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62, 573-578

TERADA, H., H. TSUBOUCHI, K. YAMAMOTO, K. HISADA und Y. SAKABE (1986):

Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in coffee beans and coffee products

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69, 960-964

TRANHAM, A. L. und D. M. WILSON (1984):

Fluorometric screening method for citrinin in corn, barley, and peanuts

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67, 37-38

TRUCKSESS, M. W. und S. W. PAGE (1986):

Examination of imported cheeses for aflatoxin M₁

J. Food Prot. 49, 632-633

TSUBOUCHI, H., H. TERADA, K. YAMAMOTO, K. HISADA und Y. SAKABE (1988):

Ochratoxin A found in commercial roast coffee

J. Agric. Food Chem. 36, 540-542

UENO, Y. (1983):

Trichothecenes - chemical, biological and toxicological aspects;
Developments in food science 4
Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam

UENO, Y. und K. ISHII (1985):

Chemical and biological properties of trichothecenes from
Fusarium sporotrichioides
in: LACEY, J. (Hrsg.): Trichothecenes and other mycotoxins:
proceedings of the International Mycotoxin Symposium held in
Sydney, Australia, August 1984, p. 307-316
John Wiley, New York

WALTKING, A. E., G. BLEFFERT und M. KIERNAN (1968):

An improved rapid physicochemical assay method for aflatoxin in
peanuts and peanut products
J. Am. Oil Chem. Soc. 45, 880-883

WARNER, R. L. und J. J. PESTKA (1987):

ELISA survey of retail grain-based food products for zearalenone
and aflatoxin B₁
J. Food Prot. 50, 502-503

WARNER, R. L., B. P. RAM, L. P. HART und J. J. PESTKA (1986):

Screening for zearalenone in corn by competitive direct
enzyme-linked immunosorbent assay
J. Agric. Food Chem. 34, 714-717

WISEMAN, D. W. und E. H. MARTH (1983a):

Stability of aflatoxin M₁ during manufacture and storage of
ice-cream and sherbet
Z. Lebensm. Unters. Forsch. 177, 22-24

DIESELBEN (1983b):

Heat and acidstability of aflatoxin M₁ in naturally and
artificially contaminated milk
Milchwissenschaft 38, 464-466

WOGAN, G. N. und S. PAGLIALUNGA (1974):

Carcinogenicity of synthetic aflatoxin M₁ in rats
Fd. Cosmet. Toxicol. 12, 381-384

YOSHIKAWA, T., C. J. MIROCHA, J. C. BEHRENS und
S. P. SWANSON (1981):

Metabolic fate of T-2 toxin in a lactating cow
Fd. Cosmet. Toxicol. 19, 31-39

Abschließend bedanke ich mich bei Prof. Dr. G. Terplan für die Überlassung des Themas und die großzügige Unterstützung bei Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Dr. E. Märtlbauer danke ich herzlich für die vielen Anregungen, seine freundliche Hilfe und die Überlassung der Software.

Weiter möchte ich mich bei Herrn Dr. A. Süß, Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, Freising, für die Überlassung der Getreideproben, bei Frau A. Biber, Landesanstalt für Ernährung, München, für die Zearalenon-HPLC-Analytik, und bei Frau I. Degle, Milchwirtschaftliche Untersuchungs- und Versuchsanstalt, Kempten, für die Käseherstellung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau G. Schaller, Frau U. Fink und Frau S. Dilger für die ausgezeichnete technische Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Weiterhin gilt mein Dank allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

L e b e n s l a u f

Richard Anton Dietrich

geboren am 30.11.1960 in Hirschau

Eltern: Maria Dietrich, geb. Bühler
Johann Dietrich

Schulbildung: Grundschule von 1967 bis 1971 in Hirschau;
von 1971 bis 1980 Gymnasium in Weiden/Opf.
Abitur 1980 in Weiden/Opf.

Studium: 11 Semester an der Tierärztlichen Fakultät der
Universität München von 1980 bis 1985

Staatsexamen: 22.10.1985

Approbation: 28.01.1986

Promotionsstudium: seit November 1985 am Lehrstuhl für Hygiene
und Technologie der Milch der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

